



ANA CAROLINE VENTRIS DE GODOY

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINÓIDE NO
CÓRTEX INSULAR SOB AS RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE AGUDO POR
RESTRIÇÃO**

**LAVRAS-MG
2021**

ANA CAROLINE VENTRIS DE GODOY

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINÓIDE NO
CÓRTEX INSULAR SOB AS RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE AGUDO POR
RESTRICÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves
Orientador

**LAVRAS-MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Godoy, Ana Caroline Ventris.

Papel da neurotransmissão endocanabinóide no córtex insular
sob as respostas cardiovasculares e autonômicas desencadeadas
pelo estresse agudo por restrição / Ana Caroline Ventris de Godoy.
- 2021.

115 p. : il.

Orientador(a): Fernando Henrique Ferrari Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Estresse. 2. Sistema endocanabinóide. 3. Respostas
autonômicas e cardiovasculares. I. Alves, Fernando Henrique
Ferrari. II. Título.

ANA CAROLINE VENTRIS DE GODOY

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINÓIDE NO CÓRTEX
INSULAR SOB AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE AGUDO POR RESTRIÇÃO**

**ROLE OF ENDOCANNABINOID NEUROTRANSMISSION IN THE
INSULAR CORTEX ON CARDIOVASCULAR AND AUTONOMIC RESPONSES
TRIGGERED BY ACUTE RESTRICTION STRESS**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de novembro de 2021

Prof. Dra. Cristiane Busnardo Santiago – UNESP-SP

Prof. Dr. Gislaine Garcia Pelosi Gomes – UEL-PR

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves (Orientador) – UFLA-MG

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves

Orientador

LAVRAS - MG

2021

*À Deus,
À minha primeira professora e mãe, Sueli,
Ao meu pai Gilmar,
Aos meus irmãos Júlio, Yasmin e Gabriel,
À todas as pessoas que me incentivaram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, pela minha vida e pela força que me concedeu durante todos estes anos de trabalho.

Aos animais que doaram suas vidas neste estudo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciências da Saúde (DSA), pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento pessoal e profissional durante o mestrado.

Ao professor Fernando Henrique Ferrari Alves, pela oportunidade de aprendizado e crescimento durante todos estes anos. Por seu empenho e força para que tudo desse certo diante de tantas dificuldades que encontramos durante a pandemia. Muito obrigada, professor Fernando!

Ao biotério da UFLA, por todo o suporte e apoio na disponibilização dos animais.

Ao Laboratório de Farmacologia da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto, por prover todo o suporte necessário para a concretização deste trabalho.

Ao professor Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, por conceder o espaço de pesquisa, pelo carinho, preocupação e acolhimento! Foi uma honra estar em seu laboratório. Muito obrigada, professor Morgan!

À Cris, por todos os seus ensinamentos, paciência, carinho e por me auxiliar durante os dias de experimento! Sempre de coração aberto e me motivando! Obrigada, Cris!

Ao Ivaldo Belém Filho, por seus ensinamentos, amizade e auxílio durante e após os experimentos, você foi essencial para este trabalho! Obrigada pela paciência e pelos inúmeros finais de semana dedicados a este trabalho! Gratidão, Ivaldo!

À Melissa Goulart, pela mentoria, parceria e ensinamentos durante todo esse tempo! Obrigada pela paciência e por sempre estar disposta a contribuir, mesmo de longe! Obrigada Mel!

À Natácia Martins, pela amizade sincera e companheirismo ao longo destes anos de estudo! Obrigada minha amiga!

Ao Mateus Tudéia por sempre acreditar em mim e me incentivar! Obrigada pela sua paciência e suporte durante tantos momentos de angústia e medo. Obrigada pela parceria, amizade e carinho durante todos estes anos!

Aos meus amigos Jordana e André pela amizade sincera, companhia e suporte emocional. Vocês foram essenciais durante esta caminhada! Obrigada por tantas comidas gostosas, momentos de descontração e risadas! Gratidão meus amigos!!!

À toda minha família, meus pais Sueli e Gilmar, meus irmãos Yasmin, Gabriel e Júlio. Quantas dificuldades, lágrimas e sorrisos passamos durante estes anos.... Não foi fácil, mas deu certo! Obrigada por todo o suporte e por cada palavra de incentivo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo 88887.505600/2020-00.

*“A glória é tanto mais tardia quanto mais duradoura há de ser,
porque todo fruto delicioso amadurece lentamente”*

Schopenhauer

RESUMO

O estresse agudo desencadeado por situações aversivas pode favorecer o surgimento de doenças neuropsiquiátricas e cardiovasculares, gerando custos pessoais, sociais e econômicos muito elevados. Por isso, é necessário o entendimento claro acerca dos mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas durante situações de estresse. O córtex insular é uma região encefálica diretamente envolvida no controle de processos comportamentais e autonômicos em contextos aversivos. A modulação destes processos pode ser executada por meio de diferentes sistemas de neurotransmissão, bem como o sistema endocanabinóide. Esta neurotransmissão está intimamente relacionada ao controle das respostas autonômicas em cenários aversivos. Entretanto, a relação do sistema endocanabinóide presente no córtex insular na modulação das respostas autonômicas em situações de estresse ainda não foi investigado. O objetivo desse estudo foi verificar o papel da neurotransmissão endocanabinóide no córtex insular sob as respostas cardiovasculares e temperatura caudal durante o estresse agudo por restrição. Para isso, foram implantadas cânulas guias, bilaterais, direcionadas ao córtex insular de ratos machos *Wistar* para a microinjeção do antagonista de receptores CB1 (AM251, dose de 0,1 nmol/100nL) e receptores TRPV1 (capsazepina, dose de 15 nmol/100nL) e para a microinjeção dos inibidores das enzimas FAAH (URB597, dose de 0,01 nmol/100nL) e MAGL (JZL184, dose de 5 nmol/100nL). Além disso, um cateter de polietileno foi implantado na artéria femoral de cada animal para as aferições da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). No dia do experimento, cada animal recebeu uma microinjeção bilateral da droga específica e 10 minutos após, foi colocado em um tubo de restrição e, em seguida, foram registradas a PA e FC durante 30 minutos. A temperatura caudal dos animais foi registrada, por meio da captura de imagens termográficas, antes da microinjeção de drogas, após a microinjeção e durante o período de restrição. Os resultados deste estudo demonstraram que a utilização do antagonista de receptores TRPV1 foi capaz de provocar o aumento da resposta pressora e taquicárdica evocada pelo estresse agudo, enquanto o aumento de 2-AG, estimulado pelo inibidor da enzima MAGL, provocou atenuação das respostas pressoras e taquicárdicas durante o estímulo aversivo. O inibidor da enzima FAAH e o bloqueio de receptores CB1 não foram capazes de modificar as respostas cardiovasculares durante o estresse agudo. Nenhum tratamento utilizado foi capaz de provocar alterações significativas na temperatura cutânea caudal. Nossos achados sugerem que a neurotransmissão endocanabinóide no córtex insular modula as respostas pressóricas e taquicárdicas de maneira inibitória por meio do canabinóide endógeno 2-AG, independente da ativação de receptores CB₁, durante o estresse agudo por restrição. Os receptores TRPV₁ também exercem papel inibitório sobre o aumento da PAM e FC durante o estresse agudo, independentemente de anandamida.

Palavras-chave: Estresse. Sistema endocanabinóide. Córtex insular. Sistema cardiovascular.

ABSTRACT

Acute stress triggered by aversive situations may favor the onset of neuropsychiatric and cardiovascular diseases, generating very high personal, social and economic costs. Therefore, a clear understanding about the mechanisms involved in the physiological responses during stressful situations is necessary. The insular cortex is a brain region directly involved in the control of behavioral and autonomic processes in aversive contexts. The modulation of these processes can be performed through different neurotransmission systems, as well as the endocannabinoid system. This neurotransmission is closely related to the control of autonomic responses in aversive scenarios. However, the relationship of the endocannabinoid system present in the insular cortex in modulating autonomic responses in stressful situations has not yet been investigated. The aim of this study was to verify the role of endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex under cardiovascular responses and tail temperature during acute restraint stress. To this end, guide cannulae were implanted bilaterally, directed to the insular cortex of male Wistar rats for microinjection of the CB1 receptor antagonist (AM251, dose 0, 1 nmol/100nL) and TRPV1 receptors (capsazepine, dose of 15 nmol/100nL) and for the microinjection of the FAAH (URB597, dose of 0.01 nmol/100nL) and MAGL (JZL184, dose of 5 nmol/100nL) enzyme inhibitors. In addition, a polyethylene catheter was implanted in the femoral artery of each animal for measurements of blood pressure (BP) and heart rate (HR). On the day of the experiment, each animal received a bilateral microinjection of the specified drug and 10 minutes later, was placed in a restriction tube and then BP and HR were recorded for 30 minutes. The tail temperature of the animals was recorded, by capturing thermographic images, before drug microinjection, after microinjection, and during the restriction period. The results of this study showed that the use of TRPV1 receptor antagonist was able to provoke the increase of pressure and tachycardic response evoked by acute stress, while the increase of 2-AG, stimulated by MAGL enzyme inhibitor, caused attenuation of pressure and tachycardic responses during aversive stimulus. The FAAH enzyme inhibitor and CB1 receptor blockade were not able to modify cardiovascular responses during acute stress. No treatment used was able to cause significant changes in caudal skin temperature. Our findings suggest that endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex modulates pressure and tachycardia responses in an inhibitory manner by means of the endogenous cannabinoid 2-AG, independent of CB1 receptor activation, during acute restriction stress. TRPV1 receptors also play an inhibitory role on the increase in MAP and HR during acute stress, independent of anandamide.

Keywords: Stress. Endocannabinoid system. Insular cortex. Cardiovascular system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronologia dos protocolos experimentais.....	29
Figura 2 – Cronologia experimental para o registro da temperatura cutânea caudal.....	33
Figura 3 – Determinação do sítio de injeção das drogas.....	38
Figura 4 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB ₁ , no córtex insular	40
Figura 5 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB ₁), submetidos ao estresse agudo por restrição.....	41
Figura 6 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo ao do estresse agudo por restrição de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB ₁)	42
Figura 7 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB ₁)	43
Figura 8 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV ₁) no córtex insular	44
Figura 9 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV ₁), submetidos ao estresse agudo por restrição.....	45
Figura 10 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo ao do estresse agudo por restrição de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV ₁)	46
Figura 11 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV ₁)	47
Figura 12 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) no córtex insular	48
Figura 13 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), submetidos ao estresse agudo por restrição	49
Figura 14 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo ao do estresse agudo por restrição de animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH)	50

Figura 15 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH)	51
Figura 16 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL) no córtex insular	52
Figura 17 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), submetidos ao estresse agudo por restrição	53
Figura 18 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do estresse agudo por restrição de animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL)	54
Figura 19 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL)	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEA	anandamida
AM251	<i>N</i> -(Piperidin-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida
ANOVA	análise de variância
AVC	acidente vascular cerebral
BVLc	bulbo ventrolateral caudal
BVLr	bulbo ventrolateral rostral
CBD	canabidiol
CC	corpo caloso
CgL	córtex cingulado
CI	córtex insular
cm	centímetros
CO	córtex orbital
CoCl ₂	cloreto de cobalto
CPF	córtex pré-frontal
DMSO	dimetilsulfóxido
DMV	núcleo dorsal motor do vago
EPM	erro padrão da média
FAAH	amida hidrolase de ácido graxo
FC	frequência cardíaca
GABA	ácido gama-aminobutírico
GABA _A	ácido gama-aminobutírico tipo A
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
i.m.	intramuscular
i.p	intraperitoneal
JZL184	éster 4-nitrofenílico do ácido 4-[<i>bis</i> (1,3-benzodioxol-5-il) hidroximetil]-1-piperidinocarboxílico
kg	quilogramas
LCA	liquido cefalorraquidiano artificial
mg	miligramas

MGL	monoacilglicerol lipase
mim	minutos
mm	milímetros
n	número de animais por grupo
NA	núcleo ambíguo
NaCl ₂	cloreto de sódio
NADA	N- araquidonoildopamina
nL	nano litros
NLET	núcleo leito da estria terminal
NMDA	N-metil-D-aspartato
nmol	nano mol
NTS	núcleo do trato solitário
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
PrL	córtex pré-límbico
PVC	policloreto de vinila
rCB ₁	receptor canabinoide do tipo 1
rCB ₂	receptor canabinoide do tipo 2
s.c.	subcutânea
sEC	sistema endocanabinóide
SGA	síndrome geral da adaptação
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
TC	temperatura cutânea caudal
TRPV ₁	receptor vaniloide de potencial transitório subtipo 1
UI	unidade internacional
URB597	Éster 3' - (Aminocarbonil) - [1,1'-bifenil] -3-ílico do ácido ciclohexilcarbâmico
USA	Estados Unidos da América
α ₁	alfa-1
α ₂	alfa-2

Δ FC	variação da frequência cardíaca
Δ PAM	variação da pressão arterial média
Δ TC	variação da temperatura cutânea caudal
Δ 9-THC	Δ 9-tetrahydrocannabinol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
12-HPETE	hidroxiperoxieicosatetraenoico

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	O sistema nervoso central e a modulação cardiovascular	19
2.1.1	O córtex insular (CI)	20
2.2	Estresse	22
2.3	Sistema endocanabinóide (sEC)	24
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Animais.....	29
4.2	Cronologia dos protocolos experimentais	29
4.3	Grupos experimentais	30
4.4	Técnica de implante de cânula guia no CI	30
4.5	Canulação da artéria femoral	31
4.6	Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	31
4.7	Microinjeção de drogas no CI	32
4.8	Temperatura cutânea da cauda	32
4.9	Estresse agudo por restrição	33
4.10	Soluções e drogas utilizadas	33
4.11	Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas	34
4.12	Análise estatística	34
5	PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS	35
5.1	Estudo da participação endocanabinoide do CI nas respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição	36
5.1.1	Efeito do tratamento no CI com AM251 sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição	36
5.1.2	Efeito do tratamento no CI com Capsazepina sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição.....	36
5.1.3	Efeito do tratamento no CI com o URB597 sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição	36
5.1.4	Efeito do tratamento no CI com o JZL184 sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição	37
6	RESULTADOS	38

6.1	Determinação do sítio de injeção das drogas	38
6.2	Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea caudal (TC) de antes e após o tratamento farmacológico do córtex insular em ratos.....	39
6.3	Efeito dos tratamentos no córtex insular de ratos sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea caudal (TC) durante o estresse por restrição.....	40
6.3.1	Efeito da administração de AM251, antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB₁), no córtex insular de ratos sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea caudal (TC) durante o estresse por restrição.....	40
6.3.2	Efeito da administração de capsazepina, antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV1), no córtex insular de ratos sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição	44
6.3.3	Efeito da administração de URB597, inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), no córtex insular de ratos sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição	48
6.3.4	Efeito da administração de JZL184, inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), no córtex insular de ratos sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição	52
7	DISCUSSÃO	56
8	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

SEGUNDA PARTE

1.	ARTIGO - Role of endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex on cardiovascular and autonomic responses triggered by acute restriction stress.....	79
-----------	--	-----------

1 INTRODUÇÃO

Situações estressantes são recorrentes ao longo da vida e a exposição ao estresse psicológico está intimamente relacionado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e doenças cardiovasculares (GULLETTE et al., 1997; COHEN et al., 2015; LIU et al. 2016; KIVIMÄKI; STEPTOE, 2018). Em situações de estresse agudo, o sistema nervoso simpático inicia ajustes cardiovasculares, estimulando o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca. Nesses contextos, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal também é ativado promovendo ajustes fisiológicos pela secreção de glicocorticoides que possibilita o funcionamento adequado do organismo frente a ameaça real ou percebida (HILTON, 1982; SCHADT; HASSER, 1998; YASUI et al., 1991; CHOUCOU et al., 2019).

O estresse por restrição em ratos é um modelo de estresse psicológico agudo inevitável utilizado para investigar alterações comportamentais (CAMPOS et al., 2013), endócrinas e cardiovasculares, capaz de provocar aumentos intensos e sustentados da frequência cardíaca, da pressão arterial e a redução da temperatura caudal (BLESSING, 2003; VIANNA; CARRIVE, 2005; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016; BUSNARDO et al., 2019; BRASIL et al., 2020). A atividade cardiovascular é modulada por diversas estruturas encefálicas, entre elas, o córtex insular (OPPENHEIMER; CECHETTO, 1990; DAMPNEY, 1994; ALVES et al., 2010; ALVES et al., 2011; ALVES et al., 2014; MARINS et al., 2016; MARINS et al., 2020). Esta área encefálica atua como um centro integrativo, sendo essencial para o processamento sensorial, cognitivo e para a modulação das funções autonômicas tanto em situações cotidianas quanto diante de contextos aversivos (ALVES et al., 2010; MARINS et al., 2016; OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016; GOGOLLA, 2017).

A compreensão das respostas fisiológicas em situações de estresse e seus mecanismos neurobiológicos ainda não são bem compreendidos. Há muitos anos, evidências demonstram que nas populações humanas o consumo de cannabis proporciona uma redução do estresse percebido, o aumento da sensação de relaxamento e amortecimento dos sintomas de ansiedade (GREEN et al., 2003). Uma vez que os efeitos fisiológicos da cannabis são mediados por receptores endocanabinoídeos, surgiu a ideia de que a neurotransmissão endocanabinoide estaria envolvida na atenuação dos efeitos desencadeados por situações estresse (MECHOULAM, 1970; DEVANE et al., 1992; SUGIURA et al., 1995; BLESSING et al., 2015). Apoiando esta hipótese, diversas evidências têm demonstrado que a neurotransmissão endocanabinoide pode modular as respostas fisiológicas durante contextos aversivos (PATEL et al., 2004;

HARTMANN et al., 2019; NEWSON et al., 2020; GOMES-DE-SOUZA et al. 2016; GOMES-DE-SOUZA et al., 2021).

O papel da neurotransmissão endocanabinoide no córtex insular sobre as respostas cardiovasculares e autonômicas em situações de estresse agudo ainda permanece inexplorado. Assim, a hipótese deste estudo é que a neurotransmissão endocanabinoide presente no córtex insular modula as respostas cardiovasculares e autonômicas durante o estresse agudo por restrição em ratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O sistema nervoso central e a modulação cardiovascular

O sistema nervoso pode ser dividido, anatomicamente, em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (SAPER; STORNETTA, 2015). O SNP inclui o sistema nervoso somático, responsável por controlar os movimentos voluntários, e o sistema nervoso autônomo (SNA), que controla as funções dos órgãos viscerais (LANGLEY, 1921; WIDDICOMBE, 1998; NILSSON, 2011). O SNA compreende três divisões: (1) simpático (SNS), (2) parassimpático (SNP) (LANGLEY, 1921; NILSSON, 2011) e (3) não-colinérgico não-adrenérgico (BURNSTOCK et al, 1963; JACOBSON, 2021), que são responsáveis por modular constantemente respostas fisiológicas como a motilidade do trato gastrointestinal, temperatura corporal, frequência respiratória e o funcionamento cardiovascular (BENARROCH, 1993; SANDERS; WARD, 2018; TAN; KNIGHT, 2018; HERRING; KALLA; PATERSON, 2019).

O controle autônomo do funcionamento cardiovascular é determinado por diferentes áreas encefálicas e por mecanismos reflexos resultantes de aferências de estruturas como receptores cardiopulmonares, quimiorreceptores e barorreceptores (GUYENET, 2006). Os receptores cardiopulmonares estão presentes, em sua maior parte, nos corpos aórticos e carotídeos, enviam aferências (mielinizadas ou não) para o bulbo, sendo estimulados por meio da distensão das câmaras cardíacas durante ou após seu preenchimento, assim, quando o fluxo sanguíneo cardíaco é reduzido, promovem o aumento do tônus simpático e diminuição do tônus vagal determinando o aumento do débito cardíaco, pressão arterial e frequência cardíaca (COLERIDGE, 1964; THORÉN, 1979). Os quimiorreceptores periféricos estão presentes nos corpos carotídeos e aórtico, possuem aferências para o centro respiratório no bulbo e para o núcleo do trato solitário (NTS), permitindo respostas rápidas em situações de hipóxia, no entanto, os quimiorreceptores centrais, presentes na superfície ventral da medula espinhal, respondem principalmente à situações de hipercapnia, por isso, o quimiorreflexo é um dos principais mecanismos de controle e regulação em respostas às modificações de concentração do oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂), sua ativação é capaz de provocar o aumento da atividade simpática, pressão arterial e frequência cardíaca, aumentando a ventilação pulmonar (WADE et al., 1970; GELFAND; LAMBERTSEN, 1972). Os barorreceptores arteriais são determinantes para o ajuste da pressão arterial (PA) a curto prazo e estão presentes em grandes

vasos, como aorta e carótida (KIRCHHEIM, 1976; DAMPNEY et al., 2002; GUYENET, 2006). Em situações de elevações da PA, as paredes destes vasos sofrem maior estiramento estimulando os barorreceptores a intensificar os potenciais de ação conduzidos ao SNC, particularmente ao NTS, via nervo vago (fibras aórticas) e glossofaríngeo (fibras carotídeas) (DAMPNEY et al., 2002).

O núcleo do trato solitário (NTS) é uma estrutura situada na região dorsomedial do bulbo, representa um sítio de convergência e integração das regiões bulbares e suprabulbares que está diretamente envolvida no controle simpático e parassimpático cardiovascular. Esse núcleo envia projeções para o núcleo dorsal motor do vago (DMV) e ao núcleo ambíguo (NA), estruturas que determinam o fluxo nervoso parassimpático e atuam na redução da frequência cardíaca (FC) (DAMPNEY, 1994; GUYENET, 1990; DAMPNEY et al., 2002). Já o tônus simpático, é estabelecido pelo NTS por meio do bulbo ventrolateral rostral (BVLr) que envia projeções aos neurônios pré-ganglionares simpáticos, o BVLr é modulado pelo bulbo ventrolateral caudal (BVLc) que atua inibindo seus neurônios e, portanto, promove a redução da contratilidade cardíaca, redução da resistência vascular periférica e renal, e por fim, a redução da PA (DAMPNEY, 1994; GUYENET, 1990; DAMPNEY et al., 2002).

pelo NTS por meio da excitação do bulbo ventrolateral caudal (BVLc) que inibe os neurônios os excitatórios do bulbo ventrolateral rostral (BVLr) determinando a redução da contratilidade cardíaca, redução da resistência vascular periférica e renal, e por fim, a redução da PA (DAMPNEY, 1994; GUYENET, 1990; DAMPNEY et al., 2002). Quando o NTS recebe menos estímulos dos barorreceptores, ele diminui a excitação sobre o BVLc que, por sua vez, reduz sua inibição exercida sobre o BVLr permitindo o aumento da PA (DAMPNEY, 1994; DAMPNEY, 2002; BLESSING; REIS, 1983; SMITH; BARRON, 1990; COLOMBARI et al., 2001; THOMAS, 2011; NASIMI; SHAFEI; ALAEI, 2012; SALMAN, 2016). Além dos mecanismos reflexos periféricos, estruturas como o hipotálamo, núcleos da amígdala, córtex pré-frontal e córtex insular, também são capazes de modular a atividade cardiovascular (DAMPNEY, 1994; VERBERNE; OWENS, 1998; ALEKSANDROV; ALEKSANDROVA, 2015).

2.1.1 O córtex insular (CI)

O CI (ou córtex pré-frontal lateral) é uma região do córtex pré-frontal que faz parte do sistema límbico (SAPER, 1982) e foi descrita pela primeira vez em 1809 por Reilly

(ALEKSANDROV; ALEKSANDROVA, 2015). Em humanos e outros primatas, essa região está sob o sulco lateral de cada hemisfério cerebral. Em geral, outros mamíferos não apresentam uma estrutura anatômica específica, mas, normalmente, está localizada na lateral dos hemisférios cerebrais como no caso dos camundongos e ratos (ALEKSANDROV; ALEKSANDROVA, 2015; GOGOLLA, 2017).

O CI pode ser subdividido em três áreas: granular, disgranular e agranular, e são extremamente heterogêneas e densamente interconectadas, funcionando como um centro cortical que opera em estruturas como o NTS, atuando no controle autonômico, em processamentos sensoriais, interocepção, comportamento social, emoções e memória (MESULAM; MUFSON, 1985; KAPP et al., 1985; NEAFSEY et al., 1986; SHIPLEY, 1982; BENARROCH et al., 2019; GIL-LIEVANA et al., 2020). Diversas regiões encefálicas fazem conexões com o CI como: a amígdala lateral e basolateral, o núcleo leito da estria terminal, núcleo médiodorsal do tálamo, hipotálamo lateral e regiões para-hipocampais, possuindo também conexões recíprocas com regiões frontais como os córtices anterior cingulado, orbitofrontal e pré-frontal medial (GOGOLLA, 2017). Logo, além de funcionar como um centro integrativo, o CI também representa uma área essencial para a percepção dos estados corporais e controle de funções autonômicas (OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016; GOGOLLA, 2017).

Um estudo recente, realizado por Marins et al. (2020), demonstrou uma estreita relação do CI e o funcionamento autonômico cardiovascular. Neste estudo, foi provocado um acidente vascular cerebral (AVC) por hemorragia focal, no CI direito e esquerdo de ratos e, como consequência, houve um aumento do número de arritmias cardíacas e constatada uma assimetria no controle cardíaco, visto que os danos provocados ao CI direito foram responsáveis por produzir maior número de arritmias quando comparado ao CI esquerdo (OPPENHEIMER; CECHETTO, 1990; OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016; MARINS et al., 2016; MARINS et al., 2020).

Diversas evidências experimentais e clínicas demonstram que o CI é capaz de modular a atividade barorreflexa, a PA e a FC (RUGGIERO et al., 1987; YASUI et al., 1991; ALVES et al., 2009a; ALVES et al., 2009b; ALVES et al., 2014; OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016; CHOUCOU et al., 2019), além disso, também está envolvido na modulação do comportamento em situações de medo, ansiedade, depressão e estresse (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; SPRENGELMEYER et al., 2011; MUTSCHLER et al., 2012; ALVES et al., 2013; SHI et al., 2018).

Durante situações de estresse, o CI apresenta importante envolvimento na modulação das funções autonômicas (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; ALVES et al., 2013; ALVES et al., 2014). Estudos realizados por Alves et al. (2010) demonstraram que a inativação neuronal do CI pela injeção local do inibidor sináptico não seletivo CoCl_2 , em ratos submetidos ao estresse agudo por restrição, provocou a diminuição das respostas de PA e FC, ou seja, foi constatado que as sinapses do CI estão diretamente envolvidas na modulação das respostas pressoras e taquicardicas (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010). Diversos tipos de receptores presentes no CI estão envolvidos em sua atividade neuromodulatória. Alves et al. (2014) também investigaram o papel de adrenoceptores do CI na modulação cardiovascular durante o estresse por restrição. Após a microinjeção local de antagonistas de receptores α_1 e α_2 , constataram que o antagonismo de receptores α_1 foi capaz de reduzir a elevação da PA e FC, enquanto o antagonismo de receptores α_2 provocou a diminuição da taquicardia sem afetar a PA, demonstrando a participação dos receptores adrenérgicos presentes no CI na modulação do sistema cardiovascular durante o estresse por restrição (ALVES et al. 2014).

Estes estudos evidenciam a importância do CI na modulação cardiovascular diante de contextos aversivos, portanto, diferentes tipos de neurotransmissões existentes na área podem fazer parte deste processo neuromodulatório. Estudos já demonstraram a presença da neurotransmissão endocanabinóide e receptores CB_1 no CI, onde apresentam um importante envolvimento na modulação da sensibilidade à dor e consolidação da memória (MOLDRICH; WENGER, 2000; O'BRIEN et al., 2014; TSAGARELI et al., 2020; SILVA-CARDOSO et al., 2021). A expressão de receptores TRPV_1 no CI também já foi relatada e participam de mecanismos envolvidos na dor neuropática, como demonstram os estudos de (KIM et al., 2018; SILVA-CARDOSO et al., 2021). Entretanto, o papel da neurotransmissão endocanabinóide no CI e seu envolvimento na modulação da atividade cardiovascular e autonômica em contextos aversivos ainda não foi relatado.

2.2 Estresse

O termo estresse foi inicialmente proposto por Hans Selye (1951) como um estado que se manifesta por meio da chamada Síndrome Geral da Adaptação (SGA) que representa um conjunto de respostas não específicas, induzidas e estereotipadas dentro de um sistema biológico, capaz de produzir modificações tanto na estrutura quanto na composição química do organismo, sendo desencadeadas durante exposições a agentes agressores (também

denominados estressores). A SGA desenvolve-se em três fases: 1) reação de alarme, 2) estágio de resistência ou alostase e 3) estágio de exaustão (SELYE, 1951).

Hans Selye (1951) definiu que as manifestações da fase de reação de alarme apresentam características como o aumento do catabolismo tecidual, elevação de catecolaminas e hipoglicemia, que podem desaparecer durante o estágio de resistência e ressurgir no estágio de exaustão, podendo levar ao colapso do organismo (SELYE, 1951). Para que a SGA se desenvolva, não é necessário que as três fases estejam presentes, uma vez que uma situação de estresse severo pode levar diretamente ao estágio de exaustão e à morte, por isso, Hans Selye (1951) considerou que a adaptabilidade dos organismos vivos apresenta uma capacidade finita (SELYE, 1951).

Os agentes estressores podem ser de caráter ambiental, como ameaças biológicas, físicas ou psicológicas, ou, ser de caráter interoceptivo como, por exemplo, modificações na osmolaridade e volume sanguíneo (KOOLHAAS et al., 2011; NALIVAICO, 2011; HERMAN, 2013). A magnitude das respostas aos agentes estressores são determinadas por particularidades do próprio agente estressor como severidade, cronicidade, controlabilidade e previsibilidade (KOOLHAAS et al., 2011; NALIVAICO, 2011; CRESTANI, 2016; HERMAN, 2013). É importante lembrar que nem sempre um estímulo estressor ao organismo irá causar prejuízos e pode até mesmo trazer benefícios ao organismo, como a prática de exercícios físicos moderado (DHABHAR, 2014; DHABHAR, 2009a; DHABHAR, 2009b; DHABHAR; MCEWEN, 1996; DHABHAR; MCEWEN, 2007; DHABHAR ET AL., 2012; DHABHAR ET AL., 1994; DHABHAR ET AL., 1995).

A resposta do organismo frente a uma situação de estresse agudo ou crônico, é decisiva diante dos efeitos que serão desencadeados (DHABHAR; MCEWEN, 1997; DHABHAR, 2014; DHABHAR, 2018). Assim, a percepção a respeito do estímulo estressor como sendo de natureza nociva ou não-nociva pode ser decisiva para determinar se a situação de estresse terá um efeito negativo ou não sobre o organismo, isto é, os efeitos estão diretamente relacionados com tipo estressor e a percepção ao estresse (DHABHAR, 2014; DHABHAR, 2018; DHABHAR; MCEWEN, 1997). Isso pode influenciar a duração das respostas fisiológicas ao estresse, tornando-se uma resposta crônica ou aguda (DHABHAR, 2019).

No estresse agudo, um conjunto de alterações fisiológicas são iniciadas, o estímulo gerado após uma percepção sensorial ameaçadora é conhecido como reação de defesa (HILTON, 1982). Nessas condições, o sistema nervoso autônomo promove alterações como: elevação da PA, aumento da FC (CRESTANI, 2016; GINTY et al., 2017; NOSAKA, 1996),

aumento da vasoconstrição visceral e tônus venoso (HILTON, 1982; MARTIN et al., 1996), aumento da vasodilatação no músculo esquelético (HILTON, 1982), redução da temperatura cutânea, elevação da temperatura interna (VIANNA; CARRIVE, 2005; NAKAMURA, 2015) e aumento da concentração de glicocorticoides (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Os mecanismos barorreflexos também são estimulados, favorecendo a elevação simultânea da PA e FC (HATTON et al., 1997; NOSAKA, 1996). Essas alterações fazem parte da resposta conhecida como “luta ou fuga”, expressão denominada pelo pesquisador americano Walter Cannon (1915) que indica as reações autonômicas que ocorre em uma situação desafiadora (CANNON, 1915; HILTON, 1982; SCHADT; HASSER, 1998).

Modelos animais podem ser utilizados para indução ao estresse (KATZ, 1981). No modelo experimental de estresse agudo por restrição, o animal é submetido à um estímulo aversivo, não-condicionado e inescapável (YOSHINO et al., 2005), em consequência disso, podem ser desenvolvidas alterações comportamentais (PADOVAN; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000; HARTMANN et al., 2019), hormonais (BUSNARDO et al., 2010) e alterações nas respostas cardiovasculares (KUBO et al., 2002; TAVARES; CORRÊA, 2006; GOMES-DE-SOUZA et al., 2021). Estudos tem demonstrado que diversos tipos de neurotransmissões estão envolvidas nesse processo e evidências demonstram claramente que o sistema endocanabinoide apresenta um papel chave na modulação de tais respostas fisiológicas e comportamentais durante situações aversivas (VIANA et al., 2019; HARTMANN et al., 2019; GOMES-DE-SOUZA et al., 2021).

2.3 Sistema endocanabinóide (sEC)

A descoberta dos endocanabinóides ocorreu após inúmeras investigações sobre o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), canabinóide derivado da erva *Cannabis sativa* e responsável por provocar seus efeitos psicotrópicos (GAONI; MECHOULAM, 1964; MECHOULAM, 1970). Também foram identificados outros compostos a partir da *Cannabis sativa*, como o canabidiol (CBD) e canabinol, sendo estes denominados fitocanabinóides (MECHOULAM, 1970). O canabidiol é uma substância que não produz efeitos psicoativos e apresenta amplas propriedades terapêuticas em distúrbios neuropsiquiátricos, podendo agir no sistema nervoso central e periférico (BLESSING et al., 2015).

Com o avanço da compreensão sobre estes compostos, foram descobertos receptores endógenos específicos para substâncias canabinoides e isolados dois agonistas endógenos, entre

eles: araquidonoil etanolamida ou anandamida (AEA) e o 2 - araquidonoilglicerol (2-AG) (DEVANE et al., 1992; SUGIURA et al., 1995). Essas substâncias foram denominadas endocanabinóides e seus efeitos são mediados principalmente pelos receptores canabinóides 1 (rCB1) e receptores canabinóides 2 (rCB2). Contudo, já foi demonstrado que receptores vaniloides de potencial transitório subtipo 1 (TRPV₁) também podem ser ativados por endocanabinóides (HOWLETT et al., 1990; MATSUDA et al., 1990; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1990; DI MARZO et al., 1994; HOWLETT, 2002; PETROCELLIS; MARZO, 2009).

Os receptores TRPV₁ são canais catiônicos não seletivos e no SNC são expressos em terminais nervosos pós-sinápticos. Esses são ativados de maneira intracelular por ligantes e atuam aumentando o influxo de cálcio, ou seja, atuam potencializando a transmissão sináptica (ROSS, 2003; KAWAHARA et al., 2011; CASAROTTO; BORTOLI; ZANGROSSI, 2012; MOREIRA et al., 2012). Estes canais podem ser ativados por moléculas exógenas como a capsaicina e resiniferatoxina, por calor nocivo (>43°C), baixo pH (<6,5) e por moléculas lipídicas endógenas como N-acil-dopaminas (N-araquidonoildopamina - NADA), produtos derivados de lipoxigenases (ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenóico – 12-HPETE) e a AEA (ZYGMUNT et al., 1999; HWANG et al., 2000; HARRISON et al., 2003; TOMINAGA; TOMINAGA, 2005; STAROWICZ et al., 2007; PETROCELLIS; MARZO, 2009). No SNC os receptores TRPV₁ não estão susceptíveis a estímulos térmicos ou nocivos como no sistema nervoso periférico e, por isso, a ativação de receptores TRPV₁ no SNC é essencialmente dependente dos seus agonistas endógenos (MATINS; TAVARES; MORGADO, 2014).

Os endocanabinóides AEA e 2-AG são compostos lipofílicos que não são armazenados em vesículas, são sintetizados “sob demanda” a partir de fosfolipídeos de membrana e são produzidos em neurônios pós-sinápticos, eles agem como mensageiros retrógrados, atravessando a fenda sináptica e estimulando os rCB₁ que estão localizados nos terminais pré-sinápticos, ou seja, o neurônio pós-sináptico é capaz de controlar a atividade do neurônio pré-sináptico (PIOMELLI, 2003; MARZO, 2006; FOWLER, 2012). A ativação de rCB₁ provoca uma redução do cálcio intracelular promovendo uma atenuação da transmissão sináptica (MOREIRA et al., 2012). Por isso, ativação de rCB₁ também pode causar redução na liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (ácido gama-aminobutírico - GABA) (KATONA et al., 1999; KATONA et al., 2001; PIOMELLI, 2003; RAMIKIE et al., 2014).

Os rCB₁ são amplamente expressos no cérebro de humanos e roedores (HERKENHAM et al., 1990; HERKENHAM et al., 1991; GLASS; FAULL; DRAGUNOW, 1997; MATO; MOLDRICH; WENGER, 2000), especialmente em áreas envolvidas no processamento de situações de ameaça e estresse, como hipocampo (KATONA et al., 1999; MARSICANO; LUTZ, 1999), amígdala (KATONA et al., 2001), núcleo leito da estria terminal (PUENTE et al., 2010) e córtex pré-frontal (LAFOURCADE et al., 2007). Já os rCB₂, inicialmente foram descritos como sendo receptores predominantemente periféricos, presentes em componentes do sistema imune (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Entretanto, recentemente, estudos apontaram que os rCB₂ estão presentes em diversos locais do SNC e são importantes na modulação de diversos processos neurobiológicos, contudo, seus locais de expressão e suas funções ainda necessitam de investigações (PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006; PERTWEE et al., 2010; ATWOOD; MACKIE, 2010; LI; KIM, 2016; MORENA et al., 2016; RATANO et al., 2018).

A ação dos endocanabinóides normalmente apresenta curta duração por serem rapidamente removidos da fenda sináptica, esse processo pode ser separado em duas etapas. Na primeira, os endocanabinóides são removidos do espaço extracelular por meio de um transportador específico ou por difusão simples. Na segunda etapa, já no interior dos neurônios, a sinalização é finalizada pela metabolização da AEA pelas enzimas amida hidrolase de ácido graxo (do inglês, FAAH), e pela metabolização do 2-AG pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (AHN; MCKINNEY; CRAVATT, 2008). A inibição farmacológica da FAAH é capaz de elevar a concentração de AEA no cérebro (KATHURIA et al., 2002), da mesma forma que o bloqueio da MAGL também resulta no aumento da concentração de 2-AG (NOMURA et al., 2008).

O sistema endocanabinóide está diretamente envolvido na modulação das respostas fisiológicas durante situações aversivas (HILL et al., 2010; HILL; MCEWEN, 2010; LUTZ et al., 2015; MORENA et al., 2016; HARTMANN et al., 2019). Em uma investigação realizada por Gomes-de-souza et al. (2016), o bloqueio de rCB₁ do núcleo leito da estria terminal (NLET), durante o estresse agudo por restrição, provocou o aumento da taquicardia, enquanto o tratamento local com inibidores das enzimas FAAH e MAGL reduziu a taquicardia, demonstrando que a neurotransmissão endocanabinóide no BNST via rCB₁ é capaz de modular a atividade cardíaca durante situações de estresse por meio da liberação local de compostos como anandamida ou 2-AG (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016).

Estudos apontam que o sistema endocanabinóide no CI apresenta papel importante na modulação da sensibilidade à dor, náusea aguda e consolidação da memória, particularmente

via rCB1 (MOLDRICH; WENGER, 2000; O'BRIEN et al., 2014; STICHT et al., 2016; TSAGARELI et al., 2020; SILVA-CARDOSO et al., 2021). Entretanto, seu envolvimento no CI sobre a modulação da atividade cardiovascular ainda é desconhecido. Por isso, é importante que investigações acerca do sistema endocanabinóide e sua relação no controle das respostas autonômicas diante de situações aversivas sejam exploradas, uma vez que o estudo sobre este sistema pode auxiliar no desenvolvimento de futuras terapias para tratar transtornos relacionados ao estresse.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar o papel da neurotransmissão endocanabinoide do CI sobre as respostas autonômicas em ratos submetidos ao estresse agudo por restrição.

3.2 Objetivos específicos

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- a) Investigar o efeito da microinjeção do antagonista seletivo de rCB_1 , AM251, na dose de 0,1 nmol/100nL, bilateralmente no CI, nas respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse agudo por restrição;
- b) Investigar o efeito da microinjeção do antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁), capsazepina, na dose de 15 nmol/100nL, bilateralmente no CI, nas respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse agudo por restrição;
- c) Investigar o efeito da microinjeção do inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), URB597, na dose de 0,01 nmol/100nL, bilateralmente no CI, nas respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse agudo por restrição;
- d) Investigar o efeito da microinjeção do inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), JZL184, na dose de 5 nmol/100nL, bilateralmente no CI, nas respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse agudo por restrição.

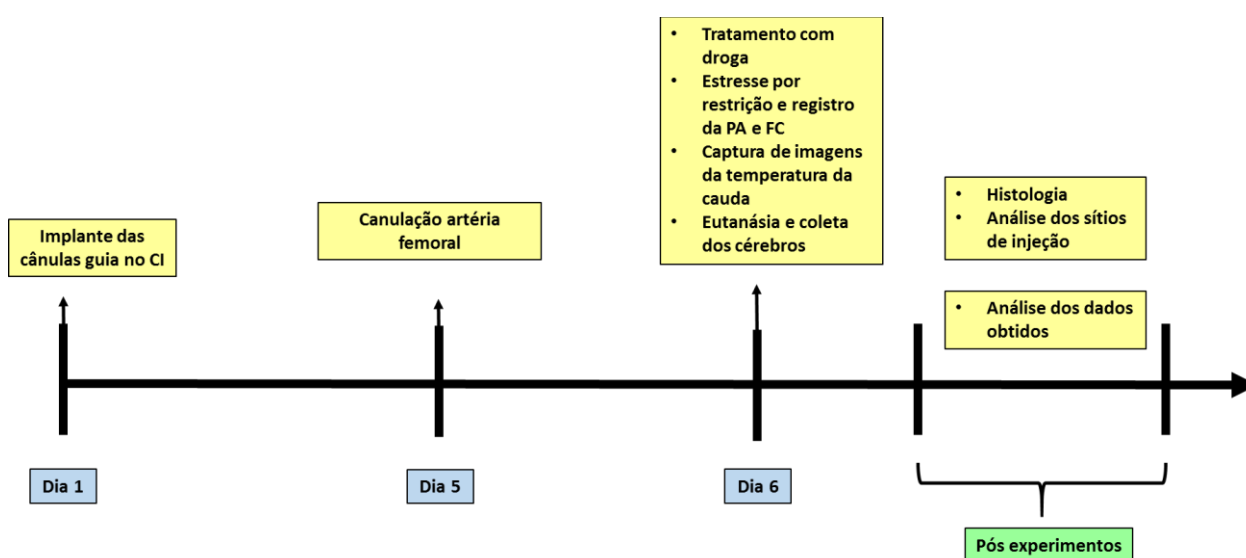
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os procedimentos experimentais obedeceram ao protocolo n° 053/2019 submetido à apreciação ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, os pesos destes animais para o experimento variaram entre 280-320 g e foram alojados em caixas de polipropileno, forradas com maravalha, mantidas em temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e em ciclo claro-escuro de 12h:12h. Os animais foram alimentados durante todo o estudo com ração padrão granulada e água *ad libitum*.

4.2 Cronologia dos protocolos experimentais

Figura 1 – Cronologia dos protocolos experimentais.



Legenda: Dia 1: cirurgia estereotáxica para implantação bilateral das cânulas guia no córtex insular. Dia 5: canulação da artéria femoral dos animais. Dia 6: tratamento dos animais com veículo ou droga e, em seguida, foram submetidos ao estresse por restrição durante 30 minutos, foram registrados a pressão arterial e frequência cardíaca, capturada as imagens da temperatura da cauda e, por fim, eutanásia e coleta dos cérebros. Pós experimentos: cortes histológicos, análise dos sítios de injeção e análise de todos os materiais e dados coletados.

Fonte: Do autor (2021).

4.3 Grupos experimentais

- LCA (100nL) – Líquido cefalorraquidiano artificial.
- AM251 (0,1 nmol/100nL) – Antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (rCB₁).
- Capsazepina (15 nmol/100nL) – Antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁).
- URB597 (0,01 nmol/100nL) – Inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH).
- JZL184 (5 nmol/100nL) – Inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL).

4.4 Técnica de implante de cânula guia no CI

Os animais foram anestesiados para este procedimento cirúrgico com tribromoetanol na dose de 250 mg/kg, intraperitoneal (i.p.). Após a realização da tricotomia na cabeça, os animais foram imobilizados em um estereotáxico para animais de pequeno porte (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA) e injetado subcutaneamente na cabeça, para anestesia local, 0,3 ml de lidocaína com vasoconstritor, para a anestesia local. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm. O perióstio foi afastado e retirado com H₂O₂ a 10%. Foi feita a assepsia local com H₂O₂ a 10% e solução fisiológica (NaCl 0,9%). Todas as coordenadas para implantação das cânulas no CI foram determinadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS; WATSON, 1997): ântero-posterior, +3,2 mm em relação ao bregma; lateral, +3,75 mm a partir do bregma; vertical, -4,5 mm em relação ao bregma, com inclinação lateral de 0° e incisivo = -3,3 mm. Com uma broca odontológica foi feita a trepanação do crânio para a implantação bilateral das cânulas guia no CI e para inserir um pequeno parafuso na calota craniana. Essas cânulas foram feitas a partir de segmentos de agulha hipodérmica com 11 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, 24G. As cânulas e o parafuso foram fixados ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Mandris com 0,2 mm de diâmetro externo e 11 mm de comprimento foram introduzidos nas cânulas para prevenir eventuais obstruções durante o período de recuperação pós-cirúrgico dos animais. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fort Dodge, São Paulo, Brasil) aplicados em 0,3 mL por via intramuscular (i.m.). Os animais também receberam 2,5 mg/Kg de analgésico e anti-inflamatório, Flunixinina Meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil), por via subcutânea (s.c), para analgesia pós-operatória (ALVES et al., 2010).

4.5 Canulação da artéria femoral

Para este procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com ketamina (Cetamin®, Syntec, Brasil) e xilazina (Xilazin®, Syntec, Brasil) em uma solução de 5 ml de ketamina à 10% e 1,6 ml de xilazina a 2%, na dose de 0,1 ml/ 100g, intraperitoneal (i.p.). Em cada animal foi realizada a dissecação da artéria femoral e introduzido um cateter de polietileno até a artéria aorta abdominal inferior. Este cateter foi previamente confeccionado manualmente através da solda de um segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) à um segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm). Minutos antes do procedimento, o cateter foi preenchido por uma solução fisiológica (NaCl a 0,9%) contendo anticoagulante (15 U/mL⁻¹ de heparina), e obstruído com um pino de metal. Após implantação, o cateter foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por meio de uma sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, cada animal recebeu 2,5 mg/Kg (s.c.) do analgésico não-esteroidal Flunixin Meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil), para analgesia pós-operatória. Após a cirurgia, os animais foram acomodados em caixas plásticas individuais e conduzidos para a sala de experimentos, para habituação do ambiente. Os registros da pressão arterial e frequência cardíaca foram realizados, por meio do cateter implantado, 24h após a cirurgia (BRASIL et al., 2021).

4.6 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Decorrido as 24h após a implantação do cateter na artéria femoral, antes de serem iniciados os registros, um volume de 0,3 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) com heparina (15 U/mL) foi inoculado no cateter do animal para evitar possíveis obstruções de coágulos. Em seguida, esse cateter foi conectado a um transdutor de pressão arterial (Hewlett Packard, USA) por um seguimento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil e a frequência cardíaca foram registradas utilizando um pré-amplificador de um polígrafo HP7754-A (Hewlett Packard, USA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (MP-100, Biopac, USA). Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram derivados da pressão arterial pulsátil e processados online pelo software AcqKnowledge 3.8.1. Foi realizado o registro basal da PAM e FC por dez minutos, com os animais ainda em suas caixas individuais, antes de colocá-los no tubo de restrição (ALVES et al., 2010; BRASIL et al., 2020).

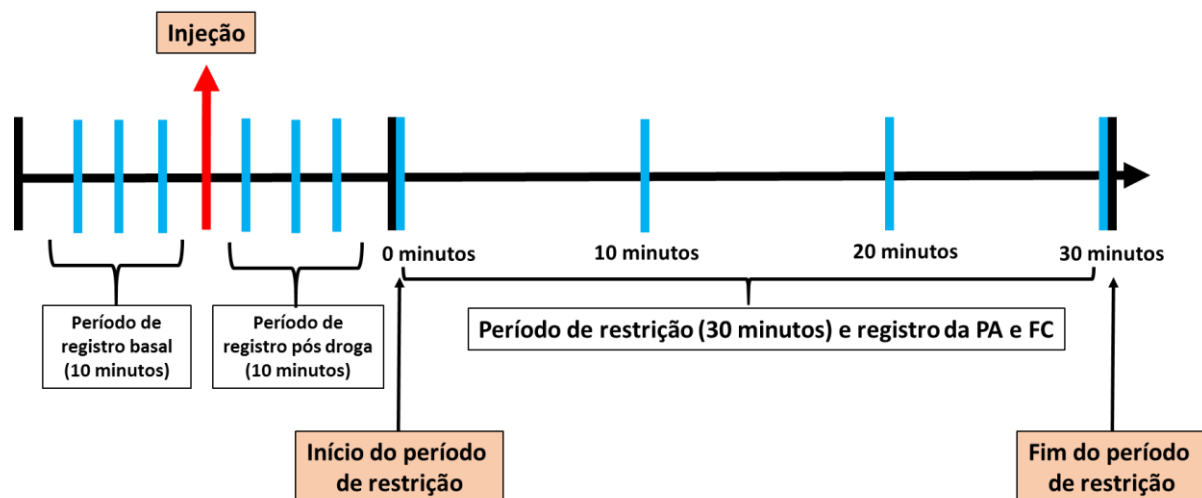
4.7 Microinjeção de drogas no CI

A agulha injetora (12 mm, 33 G, SmallParts, Lagos de Miami, FL, EUA) utilizada para microinjeção das drogas no CI, foi confeccionada um milímetro mais longa em relação à cânula guia fixada ao crânio e foi conectada a uma seringa de 2 µl (7002-KH, Hamilton Co., Reno, NV, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). Após os 10 minutos do registro cardiovascular basal, ainda em sua *home cage*, a agulha injetora foi inserida na cânula guia para a injeção da droga ou veículo. As drogas foram injetadas nas duas cânulas (uma por vez) em um volume de 100 nL para cada cânula. Após a injeção, foi aguardado 30 segundos e a agulha foi retirada e inserida na segunda cânula guia para microinjeção no CI contralateral. Após a microinjeção e decorrido mais 10 minutos, o animal foi inserido no tubo de restrição (ALVES et al., 2013; HAN et al., 2015).

4.8 Temperatura cutânea da cauda

A temperatura cutânea da cauda, foi registrada por meio da câmera térmica Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010 (Infra Red Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, USA) a uma distância de 50 cm. As imagens foram capturadas durante o período de registro basal da PAM e FC, de três em três minutos após a injeção local da droga ou veículo. Após a entrada do animal no tubo de restrição, foram capturadas imagens da temperatura da cauda de 10 em 10 minutos, durante o período de 30 minutos de restrição (Figura 2). A análise foi realizada por um software de análise termográfica e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor. A medida de temperatura foi realizada em 10 pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (CRUZ et al., 2012; GOUVEIA et al., 2016)

Figura 2 – Cronologia experimental para o registro da temperatura cutânea caudal.



Legenda: Durante o período de registro basal 3 imagens térmicas foram capturadas com intervalo de tempo de 3 minutos entre elas. Após a injeção do veículo ou droga, foram capturadas mais 3 imagens térmicas com intervalo de tempo de 3 minutos entre cada uma. Iniciado o período de restrição, foram capturadas mais 4 imagens, com intervalo de 10 minutos entre cada imagem capturada (0, 10, 20 e 30 minutos). As marcações em azul representam o momento em que as imagens foram capturadas. A seta vermelha representa o momento da injeção do veículo ou droga.

Fonte: Do autor (2021).

4.9 Estresse agudo por restrição

O tubo de restrição utilizado era constituído por um segmento de policloreto de vinila (PVC), com assoalho plano, elevado a 5 cm do chão, medindo 15 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro. O registro basal da PA e FC foi iniciado antes do animal ser colocado no tubo, ou seja, ainda em sua *home cage*. Decorrido 10 minutos após a injeção da droga ou veículo, o registro prosseguiu com o animal dentro do tubo de restrição. O animal permaneceu no tubo de restrição por 30 minutos (ALVES et al., 2010).

4.10 Soluções e drogas utilizadas

Líquido cefalorraquidiano artificial – LCA (NaCl 100 mM; Na₃PO₄ 2 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 1,0 mM; NaHCO₃ 27 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH=7,4); ketamina (União Química, Brasil) e xilazina (Syntec, Brasil) - anestésico utilizado para os procedimentos cirúrgicos para a análise dos parâmetros autonômicos, uretana (SIGMA, EUA) - anestésico utilizado para a perfusão dos animais; AM251 (Tocris, MO, EUA) antagonista seletivo de receptores CB1; capsazepina (Tocris, MO, EUA) - antagonista seletivo do receptor vaniloide 1; URB597

(Tocris, MO, EUA) - inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo; JZL184 (Tocris, MO, EUA) - inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase; Flunixin Meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil) - analgésico utilizado como profilático após a cirurgia estereotáxica e canulação da artéria femoral, Pentabiótico veterinário (Fort Dodge, São Paulo, Brasil) - antibiótico administrado como profilático após a cirurgia estereotáxica.

4.11 Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas

Após a finalização dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana, na dose de 1,2 mg/kg, por via i.p. Em seguida, foi injetado no mesmo volume da injeção das drogas (100nL em cada cânula guia) do corante azul de Evans a 1% para a determinação dos sítios de injeção. Em seguida, os animais foram submetidos à perfusão cerebral. Para isso, a caixa torácica foi aberta para exposição do coração e a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Em seguida, uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo e foi feita uma incisão no átrio direito para o escoamento do sangue e do perfusato. A perfusão foi inicialmente realizada com 20 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%, e depois por 20 mL de solução tamponada de formalina a 10%. Após realizado esse procedimento, os cérebros foram retirados da caixa craniana e conservados em solução tamponada de formalina a 10%. Posteriormente, os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato (CM, Leica, Wetzlar, Alemanha). Foram feitas diversas secções coronais de 80 µm de espessura da região do CI, que foram imediatamente dispostas em lâminas e, em seguida, analisadas utilizando-se o atlas como referência (PAXINOS; WATSON, 1997).

4.12 Análise estatística

O programa Prism 8.0.1 (GraphPad, USA) foi utilizado para a realização da análise estatística dos dados, que foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores basais (“pré e pós-droga”) de pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea caudal foram comparados pelo teste t de *Student*, em caso de resultados diferentes, os valores “pós-droga” foram utilizados para normalização dos dados para a posterior realização da ANOVA two-way. As alterações cardiovasculares e de temperatura cutânea caudal foram analisadas utilizando a ANOVA two-way (tempo e tratamento) para medidas repetidas (tempo), em caso de resultados diferentes ($p < 0,05$) o pós-teste Bonferroni foi realizado.

5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Após cinco dias da cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas-guia os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral e dispostos em caixas individuais para recuperação cirúrgica. No dia seguinte, os animais foram levados em suas respectivas caixas para a sala de experimentação novamente. Cada animal foi conectado ao sistema de registro de pressão arterial para registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) basal por um período de dez minutos e, também, foram capturadas três imagens da cauda de cada animal para a análise de temperatura cutânea basal. Em seguida, foi realizada a microinjeção central da droga ou veículo no CI dos animais, capturadas mais 3 imagens da temperatura caudal e após dez minutos foram submetidos ao estresse por restrição. Ainda conectado ao sistema de registro da pressão arterial, o animal foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 30 minutos. Uma imagem da temperatura caudal foi capturada imediatamente após a entrada do animal no tubo de restrição, depois novamente aos dez, vinte e trinta minutos. A PAP e FC foram registradas durante todo o período de restrição. Finalizado o período de restrição, os animais foram eutanasiados, perfundidos com solução fisiológica e, em seguida, com solução formalina. Os cérebros foram retirados e armazenados em frascos preenchidos com formol para sua posterior secção e análise dos sítios de injeção.

5.1 Estudo da participação endocanabinoide do CI nas respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição

Para investigar o papel da neurotransmissão endocanabinoide do CI sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal ao estresse por restrição foram utilizadas as seguintes drogas: AM251, Capsazepina, URB597 e JZL184.

5.1.1 Efeito do tratamento no CI com AM251 sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Este tratamento teve por objetivo verificar o envolvimento dos rCB₁, presentes no CI, sobre respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição. Para isso, foi utilizado o antagonista seletivo de rCB₁, AM251 (0,1 nmol/100nL) (GOMES-DE-SOUZA et al., 2021).

5.1.2 Efeito do tratamento no CI com Capsazepina sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Este tratamento teve por objetivo verificar a participação dos receptores vaniloides 1 (TRPV₁), presentes no CI, sobre respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição. Para isso, foi utilizado o antagonista seletivo do receptor vaniloide, Capsazepina (15 nmol/100nL) (LAGATTA et al., 2018).

5.1.3 Efeito do tratamento no CI com o URB597 sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Este tratamento teve por objetivo realizar a inibição da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) provocando um conseqüente aumento da disponibilidade de anandamida no CI e, assim, verificar seus possíveis efeitos sobre as respostas cardiovasculares e de temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição. Para isso, foi utilizado o inibidor seletivo da FAAH, URB597 (0,01 nmol/100nL) (LISBOA et al., 2008; HARTMANN et al., 2019).

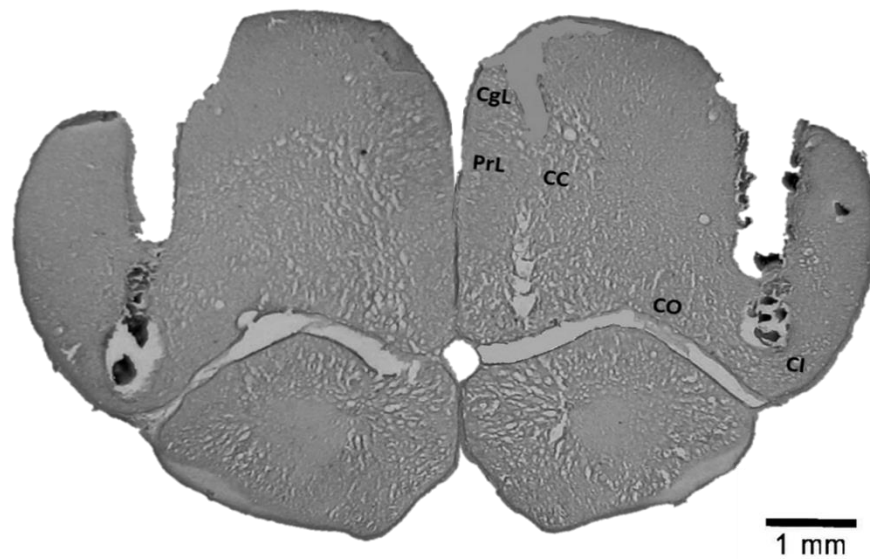
5.1.4 Efeito do tratamento no CI com o JZL184 sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Este tratamento teve por objetivo realizar a inibição da monoacilglicerol lipase (MAGL), provocando um consequente aumento da disponibilidade de 2-AG no CI e, assim, verificar seus possíveis efeitos sobre as respostas cardiovasculares e de temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição. Para isso, foi utilizado o inibidor da MAGL, JZL184 (5 nmol/100nL) (SCIOLINO et al., 2011).

6 RESULTADOS

6.1 Determinação do sítio de injeção das drogas

Figura 3 – Fotomicrografia representativa de uma secção coronal do cérebro de rato demonstrando o sítio da microinjeção na região do córtex insular.



Legenda: Abreviações: córtex cingulado (Cgl), córtex pré-límbico (PrL), corpo caloso (CC), córtex orbital (CO), córtex insular (CI). Secção coronal representativa da coordenada 4.20 mm em relação ao bregma baseado no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson (2006).

Fonte: Do autor (2021).

6.2 Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea caudal (TC) de antes e após o tratamento farmacológico do córtex insular em ratos

Os efeitos de todos os tratamentos sobre os parâmetros basais de PAM, FC e TC são apresentados na Tabela 1. A microinjeção bilateral no CI do antagonista seletivo para rCB₁, AM251, na dose de 0,1 nmol/100nL, não alterou os valores basais de PAM ou da TC, entretanto, os valores basais de FC aumentaram. Já a microinjeção com o antagonista seletivo para receptores TRPV₁, capsazepina, na dose de 15 nmol/100nL, provocou o aumento dos valores basais de PAM e FC, porém, a TC basal pós-tratamento não apresentou diferença. O tratamento com o inibidor seletivo da MAGL, JZL184, na dose de 5 nmol/100nL aumentou os parâmetros basais de PAM e FC, mas também não provocou alterações na TC. A microinjeção com o inibidor seletivo da FAAH, URB597, na dose de 0,01 nmol/100nL, não foi capaz de desencadear alterações nos valores basais de PAM, FC ou TC.

Tabela 1 – Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea caudal (TC) antes e após o tratamento farmacológico do córtex insular (CI) com o antagonista seletivo de rCB₁, o antagonista seletivo de receptores TRPV₁, o inibidor da enzima FAAH e o inibidor da enzima MAGL.

Grupos	PAM ± EPM (mmHg)				FC ± EPM (bpm)				TC ± EPM (°C)						
	n	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	t
LCA	7	114,45 ±2,54	115,01 ±3,75	0,88	0,15	7	337,39 ±16,55	350,85 ±10,95	0,17	1,52	7	28,53 ±0,83	28,78 ±0,38	0,66	0,46
AM251	8	104,62 ±2,20	107,89 ±2,19	0,06	2,14	8	352,98 ±11,84	373,27 ±15,27	0,04*	2,46	8	28,39 ±0,77	28,40 ±0,86	0,98	0,02
CAP	9	109,84 ±2,76	113,40 ±2,64	0,0005*	5,66	9	340,84 ±11,08	360,65 ±11,55	0,01*	3,02	9	29,24 ±0,83	28,39 ±0,68	0,08	1,94
URB 597	8	109,65 ±4,58	109,67 ±3,36	0,99	0,01	8	352,09 ±16,08	345,08 ±8,52	0,48	0,73	8	29,63 ±1,08	30,66 ±1,00	0,40	0,88
JZL 184	8	109,41 ±3,60	112,73 ±3,21	0,03*	2,65	8	350,72 ±7,80	389,60 ±15,70	0,04*	2,46	8	29,37 ±0,52	28,90 ±0,70	0,11	1,82

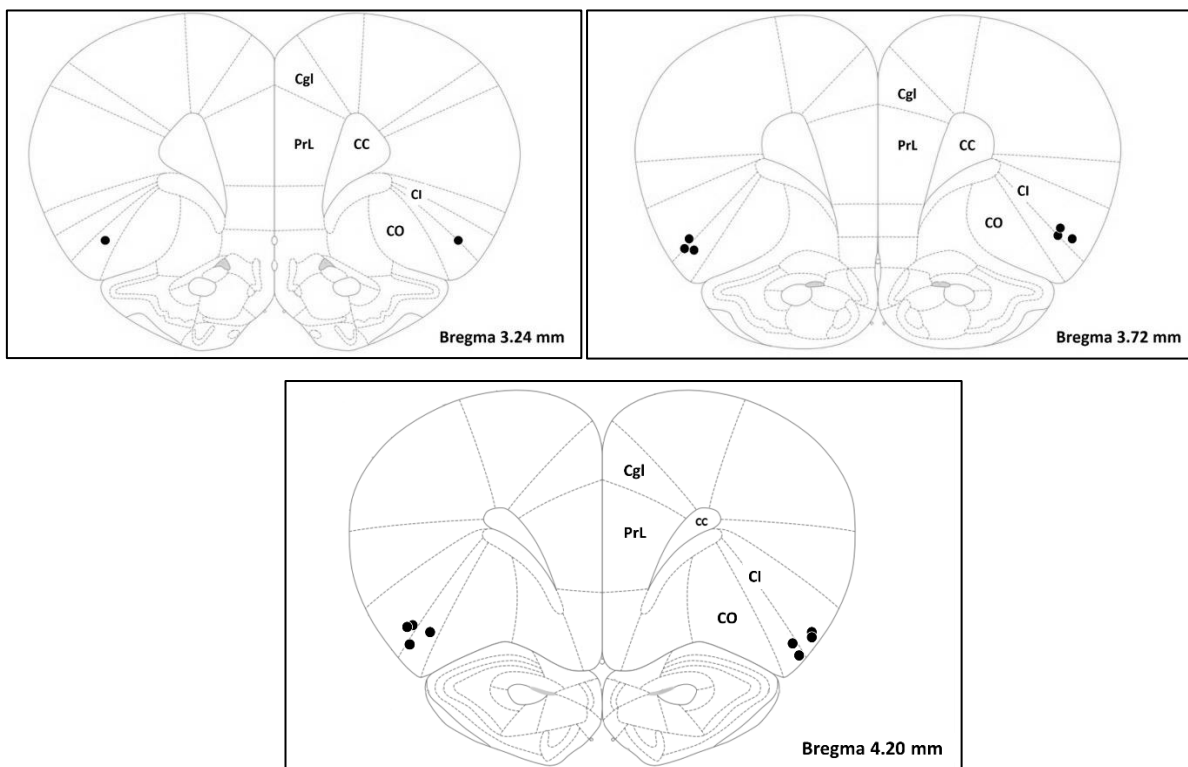
Nota: Resultado do teste t pareado de Student dos valores basais de PAM, FC e TC, antes e após as microinjeções de líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), antagonista seletivo de rCB₁, AM251 (0,1 nmol/100nL), o antagonista seletivo de receptores TRPV₁, capsazepina (15 nmol/100nL), o inibidor da enzima FAAH, URB597 (0,01 nmol/100nL), e o inibidor da enzima MAGL, JZL184 (5 nmol/100nL). Dados coletados 10 minutos imediatamente antes da injeção em comparação com os coletados 10 minutos antes do início da exposição ao estresse. CAP: abreviação de “capsazepina”. * diferença p < 0,05. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM).

Fonte: Do autor (2021).

6.3 Efeito dos tratamentos no córtex insular de ratos sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea caudal (TC) durante o estresse por restrição

6.3.1 Efeito da administração de AM251, antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB_1), no córtex insular de ratos sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea caudal (TC) durante o estresse por restrição

Figura 4 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB_1 no córtex insular.



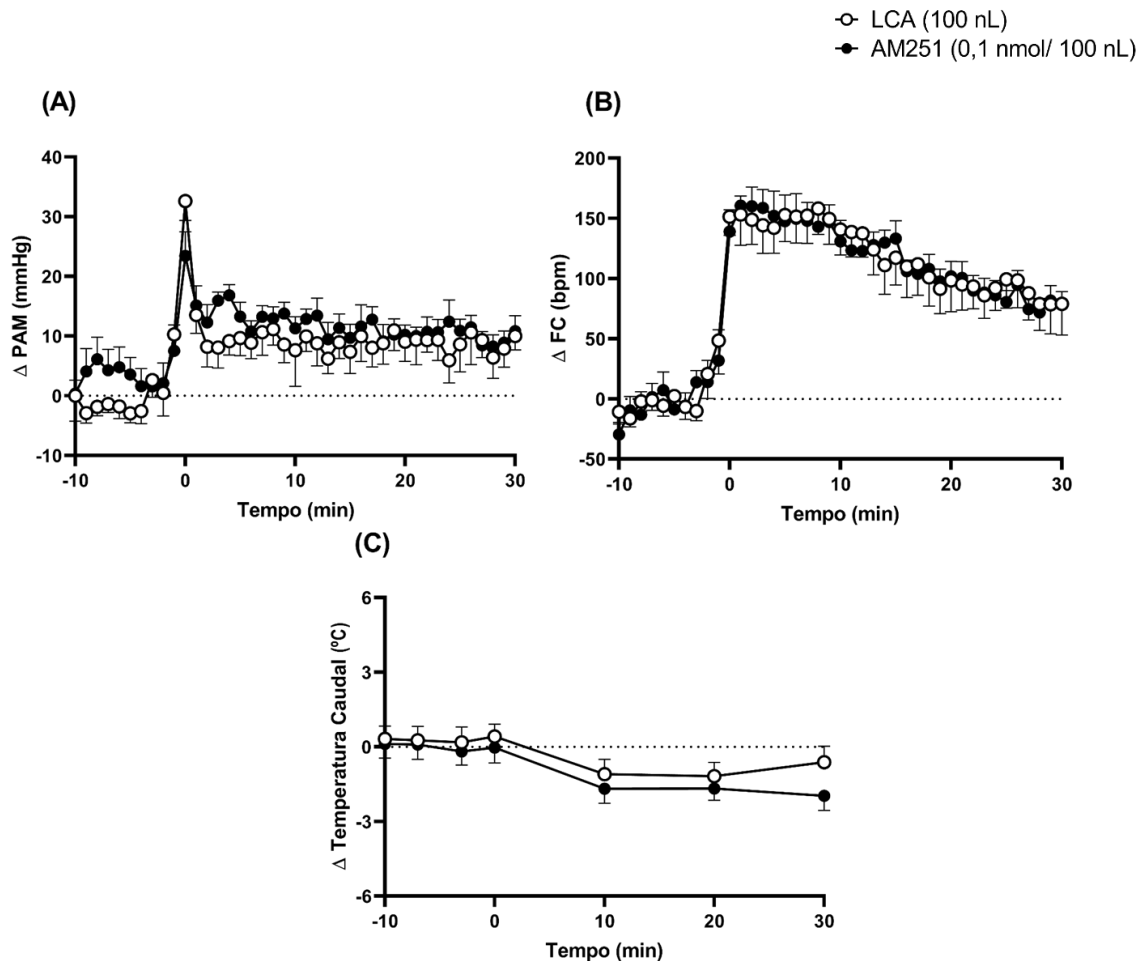
Legenda: Representação diagramática dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB_1), AM251 (0,1 nmol/100nL), figuras baseadas no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson (2006). Abreviações: córtex cingulado (Cgl), córtex pré-límbico (PrL), corpo caloso (CC), córtex orbital (CO), córtex insular (CI).

Fonte: Do autor (2021).

As alterações da PAM, FC e TC evocadas pelo estresse agudo por restrição em roedores tratados com AM251, na dose de 0,1 nmol/100nL, são apresentadas na Figura 5. O estresse agudo por restrição desencadeou ao longo do tempo o aumento da PAM (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,480)} = 9,586$), da FC (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,480)} = 38$) e a redução da TC (tempo: $p = 0,0003$; $F_{(1,910;24,83)} = 11,88$). O tratamento com AM251 não foi capaz de modificar a resposta pressórica

(tratamento: $p = 0,3442$; $F_{(1,12)} = 0,9699$), a resposta taquicárdica (tratamento: $p = 0,9323$; $F_{(1,12)} = 0,007517$) e a redução da TC (tratamento: $p = 0,4609$; $F_{(1,13)} = 0,5775$), desencadeadas pelo estresse agudo. Houve interação entre tempo e tratamento sobre a resposta taquicárdica (interação: $p > 0,9999$; $F_{(40,480)} = 0,3359$), o mesmo não ocorreu sobre a resposta pressora (interação: $p = 0,5728$; $F_{(40,480)} = 0,9431$) e a redução da TC (interação: $p = 0,6364$; $F_{(6,78)} = 0,7177$) (FIGURAS 5, 6 e 7).

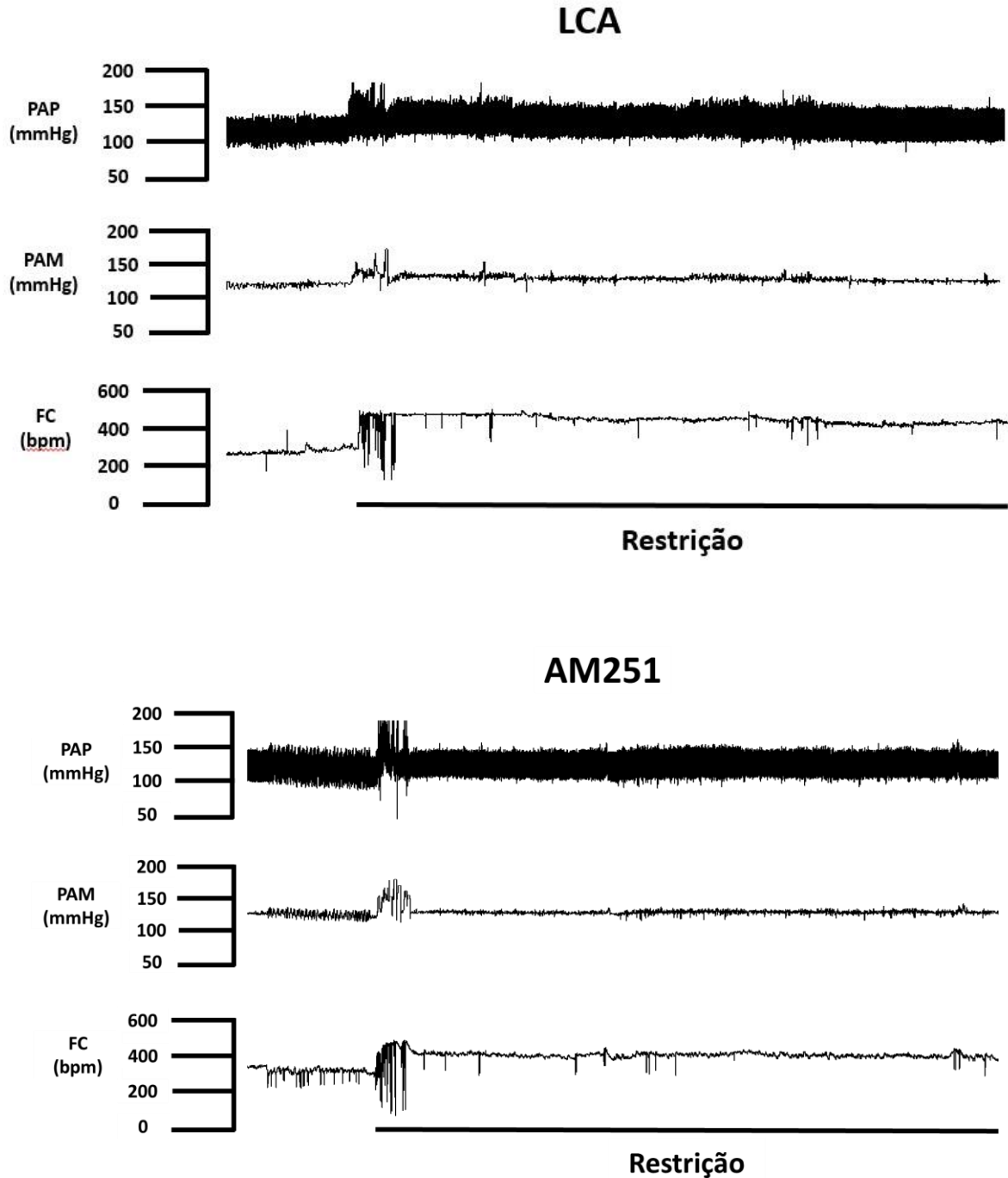
Figura 5 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB_1), submetidos ao estresse agudo por restrição.



Legenda: (A) Variação da pressão arterial média (Δ PAM), (B) frequência cardíaca (Δ FC), (C) temperatura caudal (Δ TC) ao longo do tempo, em animais submetidos ao estresse agudo por restrição tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB_1), AM251 na dose de 0,1 nmol/100nL (círculos pretos) ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (círculos brancos). A representação gráfica “-10 (minutos)” indica os dez minutos anteriores ao início do estresse por restrição e instante da injeção. No tempo 0 (minutos) os animais foram submetidos ao estresse agudo por restrição. Os círculos e triângulos representam a média e as barras o erro padrão da média \pm EPM. Realizado o teste ANOVA two-way para medidas repetidas. $p < 0,05$.

Fonte: Do autor (2021).

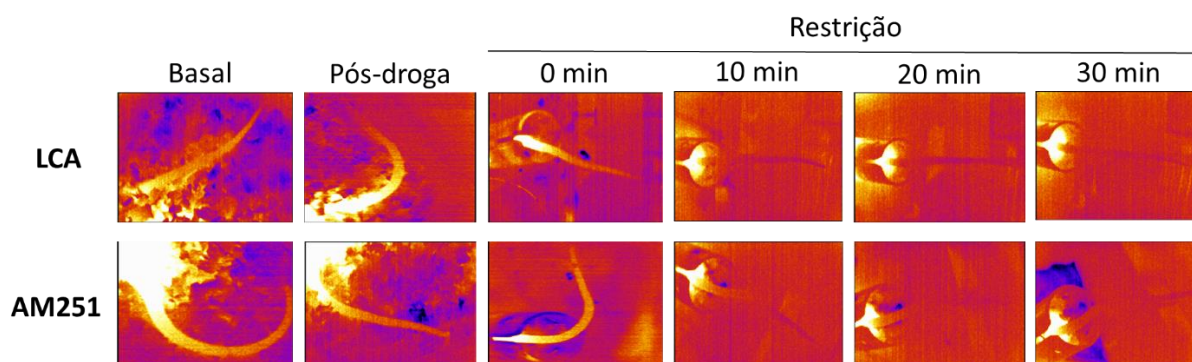
Figura 6 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do estresse agudo por restrição de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB1).



Legenda: Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB₁), AM251 na dose de 0,1 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 7 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB₁).

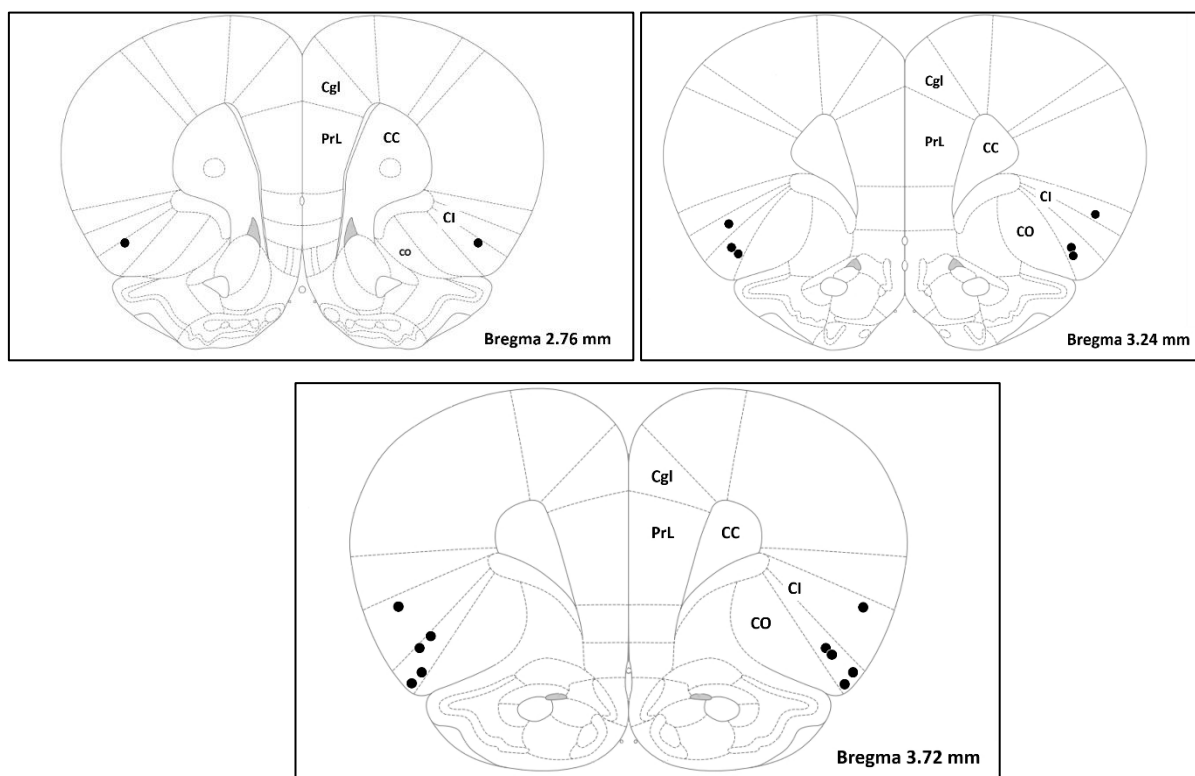


Legenda: Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor canabinoide 1 (CB₁), AM251 na dose de 0,1 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição. A variação de cores representa a variação da temperatura, sendo a cor azul a representação de temperaturas mais baixas e a cor amarela a representação de temperaturas mais elevadas.

Fonte: Do autor (2021).

6.3.2 *Efeito da administração de capsazepina, antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁), no córtex insular de ratos sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição*

Figura 8 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁) no córtex insular.



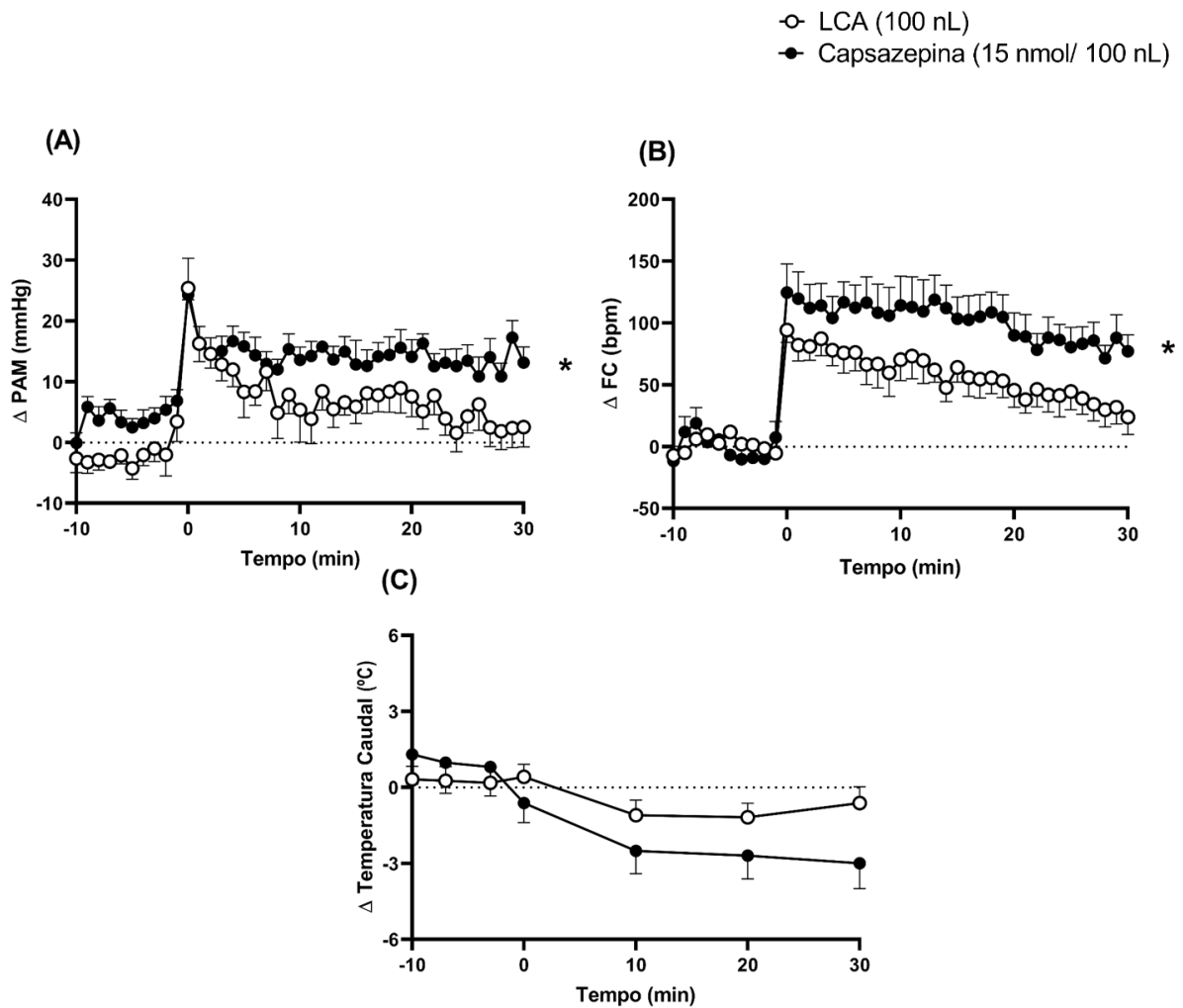
Legenda: Representação diagramática dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁), capsazepina, (15 nmol/100nL), figuras baseadas no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson (2006). Abreviações: córtex cingulado (Cgl), córtex pré-límbico (PrL), corpo caloso (CC), córtex orbital (CO), córtex insular (CI).

Fonte: Do autor (2021).

As alterações da PAM, FC e TC evocadas pelo estresse agudo por restrição em roedores tratados com capsazepina, na dose de 15 nmol/100nL, são apresentadas na Figura 9. O estresse agudo por restrição desencadeou ao longo do tempo o aumento da PAM (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,520)} = 10,59$), da FC (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,600)} = 23,08$) e a redução da TC (tempo: $p = 0,0002$; $F_{(2,347;32,86)} = 10,31$). O tratamento com capsazepina aumentou a resposta pressórica (tratamento: $p = 0,0154$; $F_{(1,13)} = 7,764$) e a resposta taquicárdica (tratamento: $p = 0,0363$; $F_{(1,15)} = 5,284$) desencadeadas pelo estresse agudo por restrição, entretanto, a redução TC não foi afetada (tratamento: $p = 0,1063$; $F_{(1,14)} = 2,980$). Houve interação entre tempo e tratamento

sobre a resposta taquicárdica (interação: $p = 0,0003$; $F_{(40,600)} = 2,012$), o mesmo não ocorreu sobre a resposta pressora (interação: $p = 0,4305$; $F_{(40,520)} = 1,026$) e a redução da TC (interação: $p = 0,7317$; $F_{(6,84)} = 0,5972$) (FIGURAS 9, 10 e 11).

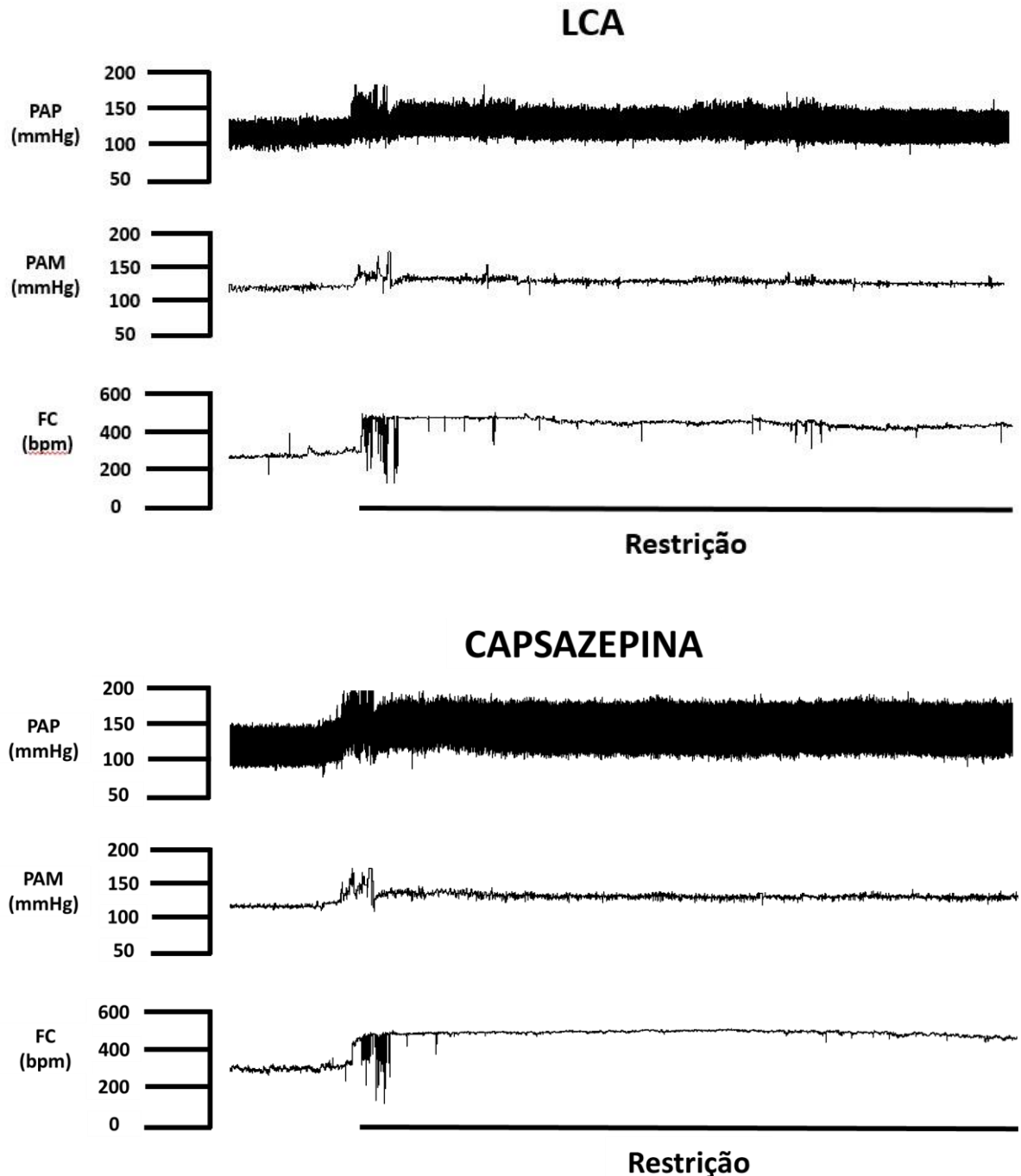
Figura 9 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁), submetidos ao estresse agudo por restrição.



Legenda: (A) Variação da pressão arterial média (Δ PAM), (B) frequência cardíaca (Δ FC), (C) temperatura caudal (Δ TC) ao longo do tempo, em animais submetidos ao estresse agudo por restrição tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁), capsazepina, na dose de 15 nmol/100nL (círculos pretos) ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (círculos brancos). A representação gráfica “-10 (minutos)” indica os dez minutos anteriores ao início do estresse por restrição e instante da injeção. No tempo 0 (minutos) os animais foram submetidos ao estresse agudo por restrição. Os círculos e losangos representam a média e as barras o erro padrão da média \pm EPM. Realizado o teste ANOVA two-way para medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni em caso de diferença significativa. * indica diferença entre o grupo tratado e LCA, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor (2021).

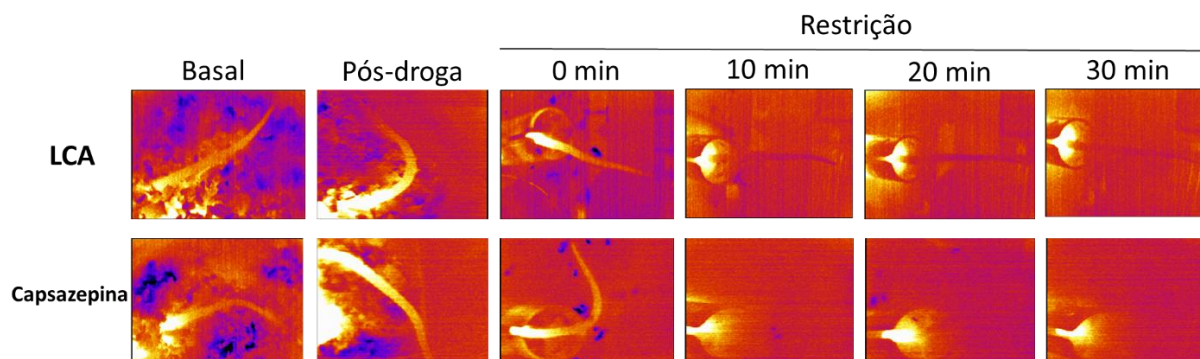
Figura 10 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do estresse agudo por restrição de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁).



Legenda: Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁), capsazepina, na dose de 15 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 11 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁).

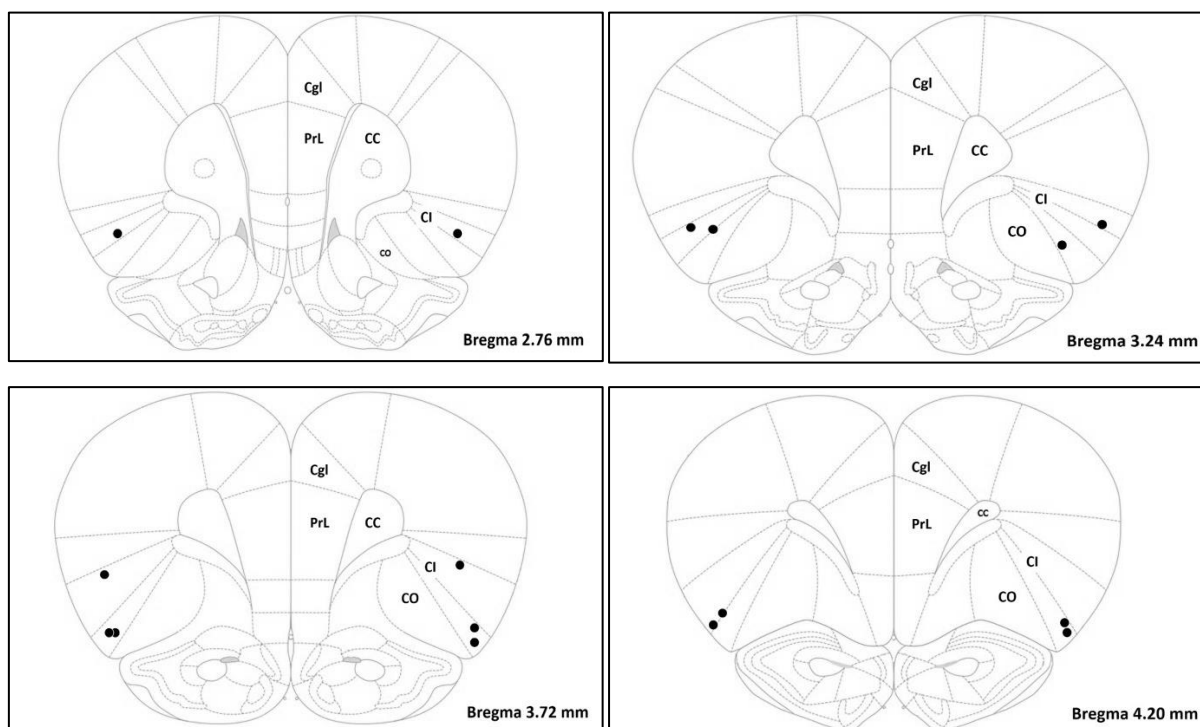


Legenda: Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o antagonista seletivo do receptor vaniloide 1 (TRPV₁), capsazepina, na dose de 15 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição. A variação de cores representa a variação da temperatura, sendo a cor azul a representação de temperaturas mais baixas e a cor amarela a representação de temperaturas mais elevadas.

Fonte: Do autor (2021).

6.3.3 *Efeito da administração de URB597, inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), no córtex insular de ratos sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição*

Figura 12 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) no córtex insular.



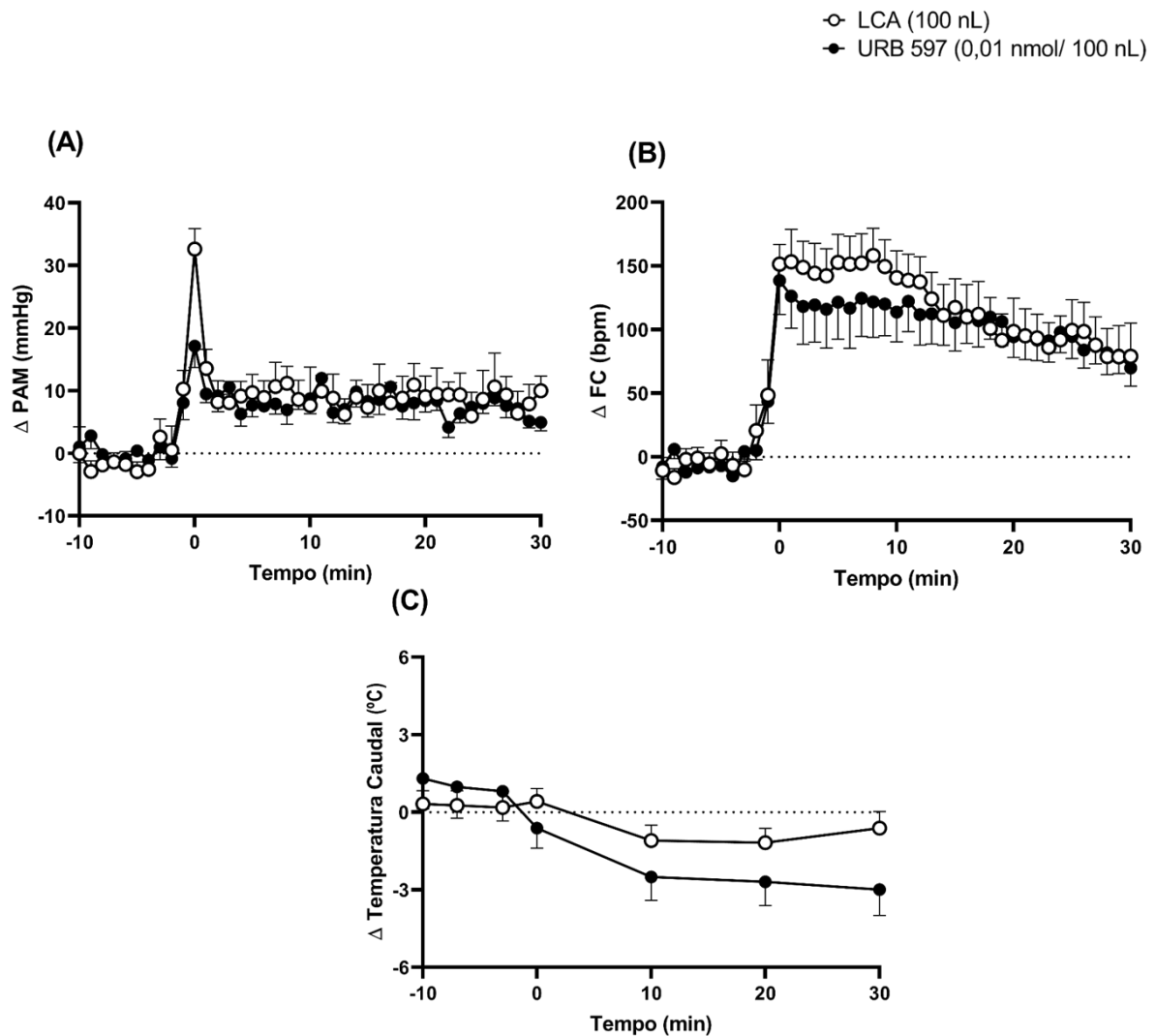
Legenda: Representação diagramática dos sítios de microinjeção do inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), URB597 (0,01 nmol/100nL), figuras baseadas no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson (2006). Abreviações: córtex cingulado (Cgl), córtex pré-límbico (PrL), corpo caloso (CC), córtex orbital (CO), córtex insular (CI).

Fonte: Do autor (2021).

As alterações da PAM, FC e TC evocadas pelo estresse agudo por restrição em roedores tratados com URB597, na dose de 0,01 nmol/100nL, são apresentadas na Figura 13. O estresse agudo por restrição desencadeou ao longo do tempo o aumento da PAM (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,480)} = 9,63$), da FC (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,480)} = 27,46$) e a redução da TC (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(1,969;25,59)} = 20,05$). O tratamento com URB597 não desencadeou modificações significativas nas respostas pressórica (tratamento: $p = 0,6077$; $F_{(1,12)} = 0,2779$), taquicárdica (tratamento: $p = 0,6624$; $F_{(1,12)} = 0,2003$) ou na redução da TC (tratamento: $p = 0,6143$; $F_{(1,13)} = 0,2665$) evocadas pelo estresse agudo. Houve interação entre tempo e tratamento na redução da TC

(interação: $p < 0,0001$; $F_{(6,78)} = 5,544$), o mesmo não ocorreu sobre a resposta pressora (interação: $p = 0,3049$; $F_{(40,480)} = 1,108$) e taquicárdica (interação: $p = 0,9928$; $F_{(40,480)} = 0,5273$) (FIGURAS 13, 14 e 15).

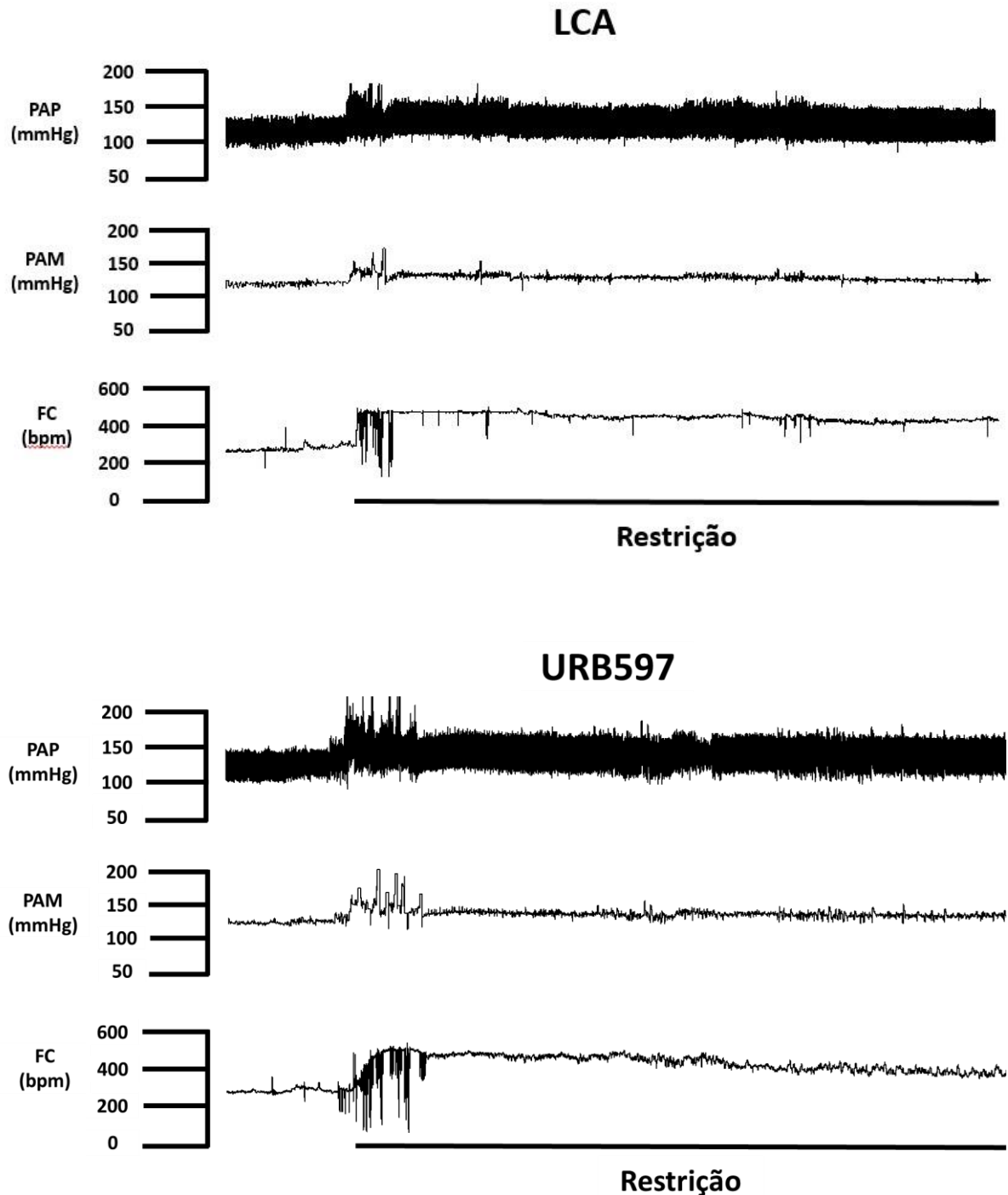
Figura 13 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), submetidos ao estresse agudo por restrição.



Legenda: (A) Variação da pressão arterial média (Δ PAM), (B) frequência cardíaca (Δ FC), (C) temperatura caudal (Δ TC) ao longo do tempo, em animais submetidos ao estresse agudo por restrição tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), URB597, na dose de 0,01 nmol/100nL (círculos pretos) ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (círculos brancos). A representação gráfica “-10 (minutos)” indica os dez minutos anteriores ao início do estresse por restrição e instante da injeção. No tempo 0 (minutos) os animais foram submetidos ao estresse agudo por restrição. Os círculos representam a média e as barras o erro padrão da média \pm EPM. Realizado o teste ANOVA two-way. $p < 0,05$.

Fonte: Do autor (2021).

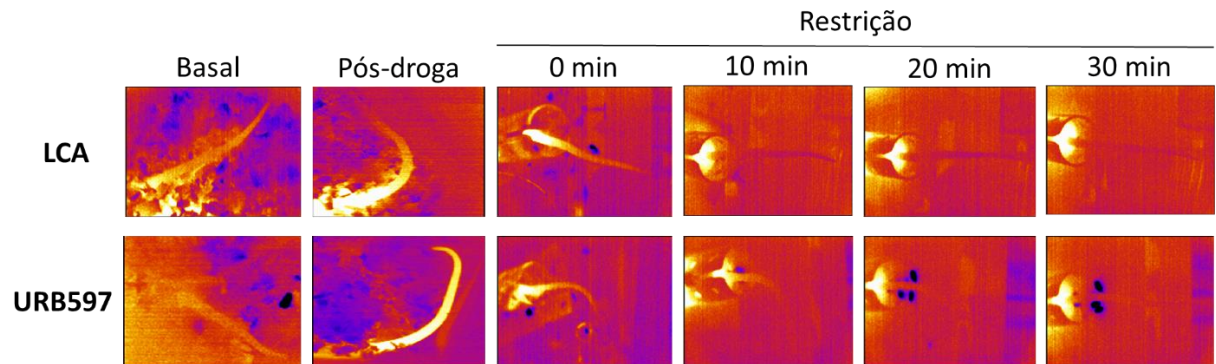
Figura 14 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do estresse agudo por restrição de animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH).



Legenda: Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), URB597, na dose de 0,01 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 15 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH).

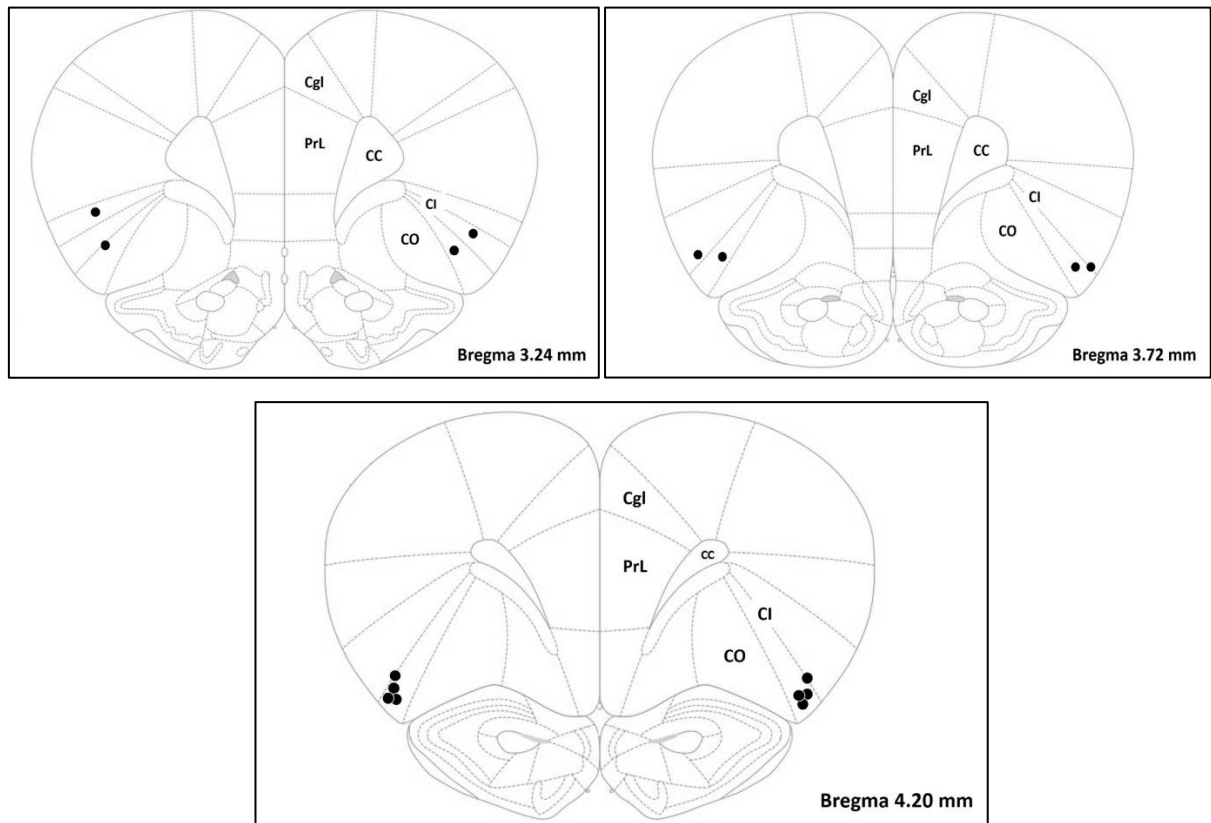


Legenda: Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o inibidor seletivo da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), URB597, na dose de 0,01 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição. A variação de cores representa a variação da temperatura, sendo a cor azul a representação de temperaturas mais baixas e a cor amarela a representação de temperaturas mais elevadas.

Fonte: Do autor (2021).

6.3.4 *Efeito da administração de JZL184, inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), no córtex insular de ratos sobre as respostas cardiovasculares e temperatura cutânea caudal durante o estresse por restrição*

Figura 16 – Representação diagramática dos sítios de microinjeção do inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL) no córtex insular.



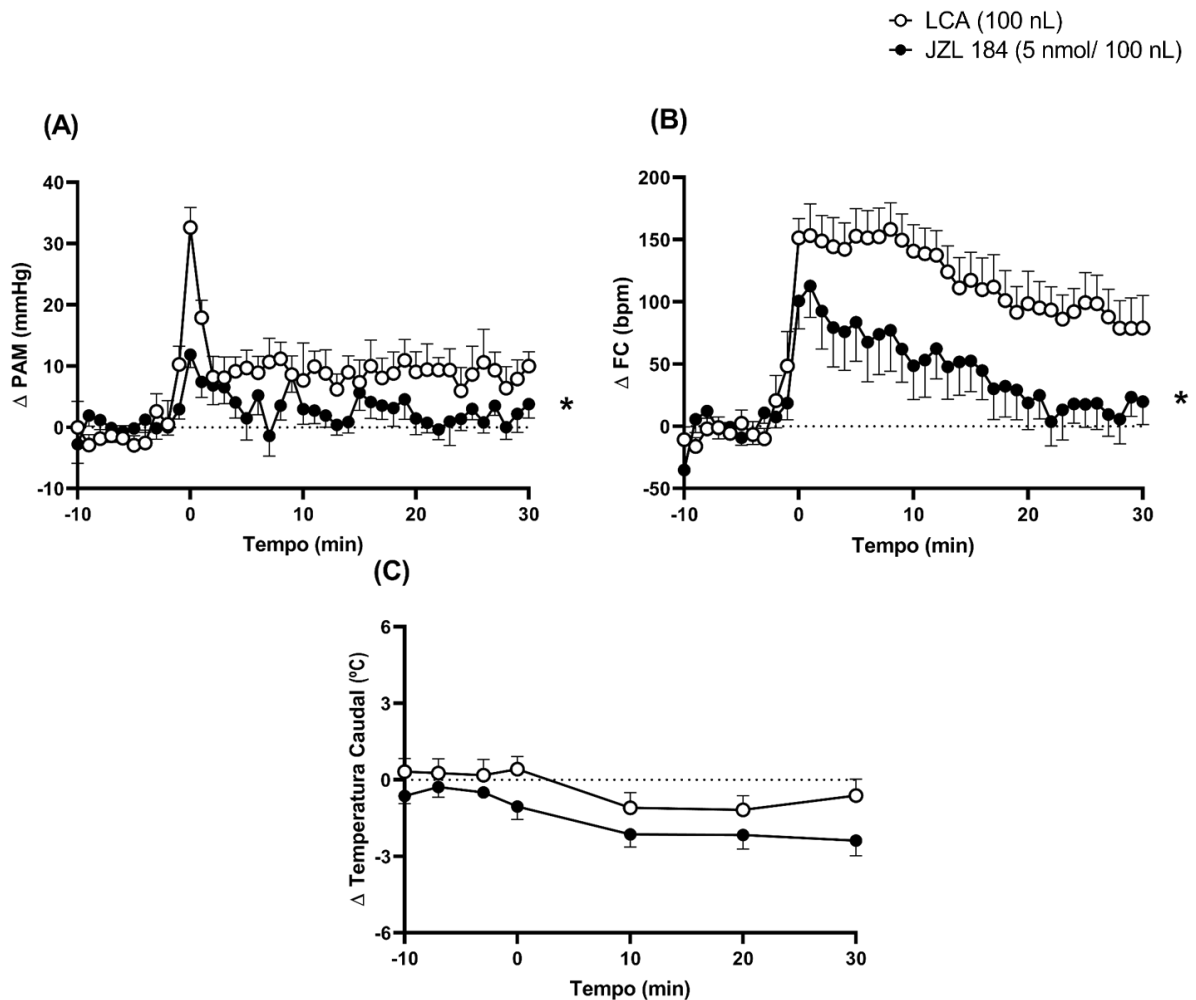
Legenda: Representação diagramática dos sítios de microinjeção o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), JZL184 (5 nmol/100nL), figuras baseadas no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson (2006). Abreviações: córtex cingulado (Cgl), córtex pré-límbico (PrL), corpo caloso (CC), córtex orbital (CO), córtex insular (CI).

Fonte: Do autor (2021).

As alterações da PAM, FC e TC evocadas pelo estresse agudo por restrição em roedores tratados com JZL184, na dose de 5 nmol/100nL, são apresentadas na Figura 17. O estresse agudo por restrição desencadeou ao longo do tempo o aumento da PAM (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,440)} = 5,851$), da FC (tempo: $p < 0,0001$; $F_{(40,480)} = 17,67$) e a redução da TC (tempo: $p = 0,0006$; $F_{(2,165;28,14)} = 9,428$). O tratamento com JZL184 diminuiu a resposta pressórica (tratamento: $p = 0,0332$; $F_{(1,11)} = 5,918$) e a resposta taquicárdica (tratamento: $p = 0,0413$; $F_{(1,12)} = 5,221$), desencadeada pelo estresse agudo por restrição, entretanto, a redução da TC

(tratamento: $p = 0,0764$; $F_{(1,13)} = 3,705$) não foi afetada. Houve interação entre tempo e tratamento tanto na resposta pressora (interação: $p = 0,0011$; $F_{(40,440)} = 1,894$) quanto taquicárdica (interação: $p < 0,0001$; $F_{(40,480)} = 2,561$), o mesmo não ocorreu na redução da TC (interação: $p = 0,6342$; $F_{(6,78)} = 0,7206$) (FIGURAS 17, 18 e 19).

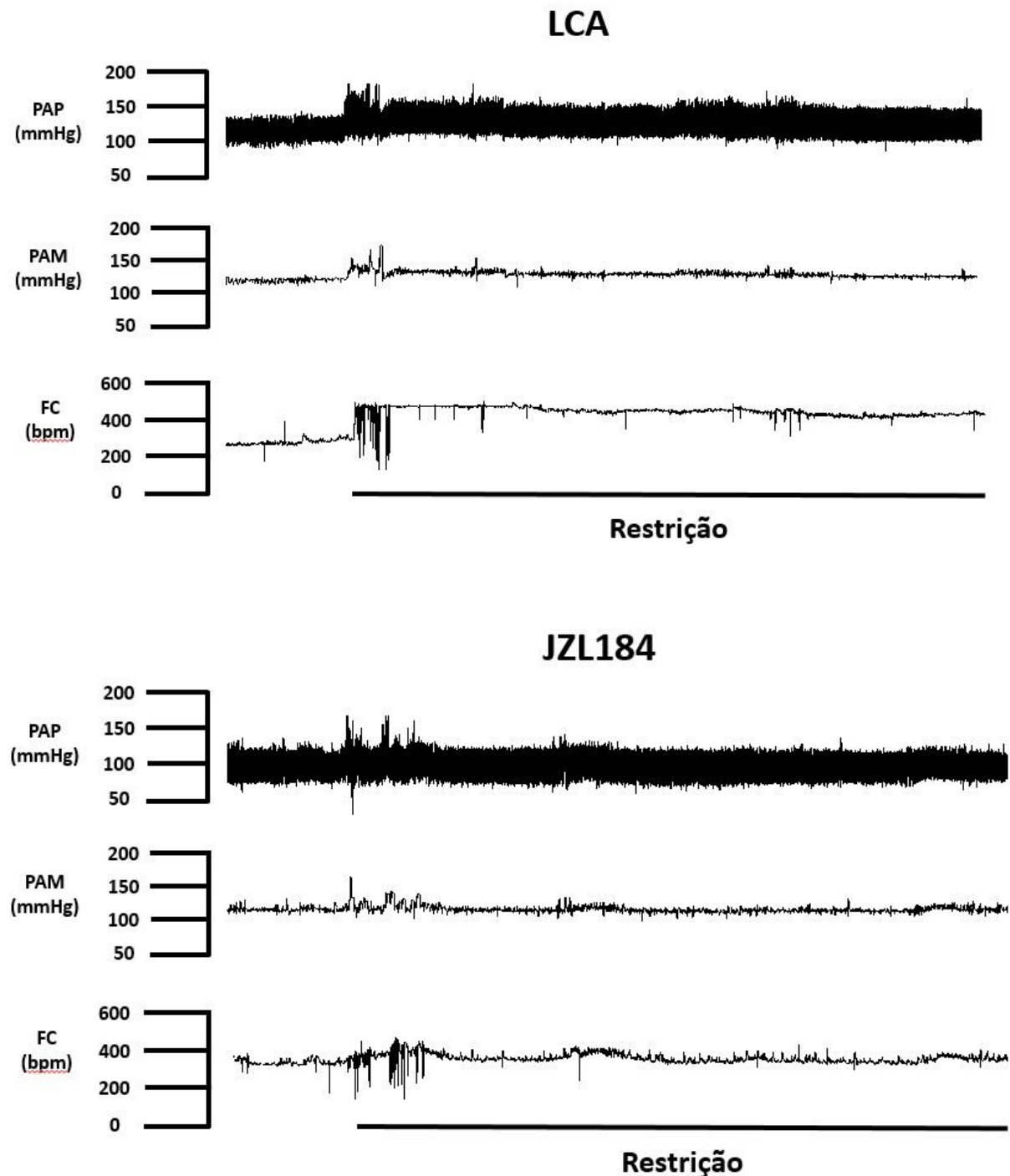
Figura 17 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea caudal (Δ TC), em animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), submetidos ao estresse agudo por restrição.



Legenda: (A) Variação da pressão arterial média (Δ PAM), (B) frequência cardíaca (Δ FC), (C) temperatura caudal (Δ TC) ao longo do tempo, em animais submetidos ao estresse agudo por restrição tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), JZL184, na dose de 5 nmol/100nL (círculos pretos) ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (círculos brancos). A representação gráfica “-10 (minutos)” indica os dez minutos anteriores ao início do estresse por restrição e instante da injeção. No tempo 0 (minutos) os animais foram submetidos ao estresse agudo por restrição. Os círculos e triângulos representam a média e as barras o erro padrão da média \pm EPM. Realizado o teste ANOVA two-way para medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni em caso de diferença significativa. * indica diferença entre o grupo tratado e LCA, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor (2021).

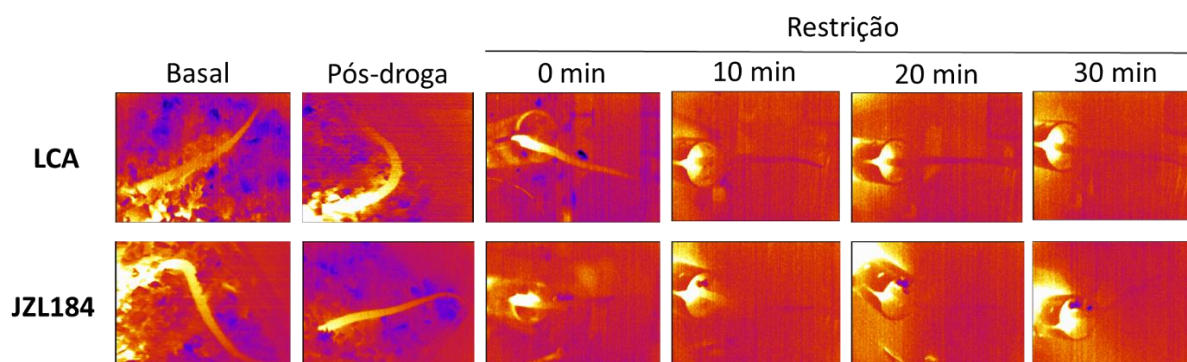
Figura 18 – Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do estresse agudo por restrição de animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL).



Legenda: Representação do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), JZL184, na dose de 5 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 19 – Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL).



Legenda: Representação termográfica da variação da temperatura cutânea caudal de animais tratados com o inibidor seletivo da monoacilglicerol lipase (MAGL), JZL184, na dose de 5 nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), submetidos ao estresse agudo por restrição. A variação de cores representa a variação da temperatura, sendo a cor azul a representação de temperaturas mais baixas e a cor amarela a representação de temperaturas mais elevadas.

Fonte: Do autor (2021).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o papel do sistema endocanabinoide, presente no córtex insular, sobre a atividade cardiovascular e a temperatura cutânea caudal de ratos submetidos ao estresse agudo por restrição, através do envolvimento de rCB₁, receptores TRPV₁ e das principais enzimas envolvidas no processo de degradação dos endocanabinoides: FAAH e MAGL. Diante dos resultados obtidos, esta investigação fornece a primeira evidência do envolvimento da neurotransmissão endocanabinoide presente no CI na modulação da atividade cardiovascular e modulação autonômica em contextos aversivos, especificamente durante o estresse agudo por restrição.

Os resultados do nosso estudo demonstraram que a microinjeção bilateral do antagonista seletivo para receptores TRPV₁, potencializou o aumento da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) desencadeado pelo estresse agudo, mas não afetou a diminuição da TC. Além disso, o aumento endógeno do endocanabinoide 2-AG na região do CI, pela inibição da enzima responsável por sua degradação, MAGL, atenuou resposta pressórica e taquicárdica durante o estresse por restrição, sem modificações nas respostas de diminuição da TC. O bloqueio de rCB₁, não promoveu efeitos sobre o aumento de PAM e FC e redução da TC ao longo do período de estresse e o mesmo não ocorreu ao inibirmos a enzima FAAH, principal responsável pela degradação da anandamida.

O estresse agudo por restrição é um modelo de estímulo aversivo bem consolidado, capaz de induzir alterações bioquímicas, comportamentais e fisiológicas relacionadas ao estresse (CAMPOS et al., 2013). Este modelo causa aumento da PAM, taquicardia e redução da temperatura cutânea em roedores, isso normalmente ocorre devido ao redirecionamento do fluxo sanguíneo das extremidades do animal, como patas e cauda, para os principais órgãos envolvidos na reação de “luta ou fuga”, como músculos e cérebro, favorecendo a elevação da temperatura interna do corpo (BLESSING, 2003; VIANNA; CARRIVE, 2005; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016; BUSNARDO et al., 2019; BRASIL et al., 2020). Embora seja importante o conhecimento a respeito das respostas fisiológicas em situações aversivas, os mecanismos neurobiológicos associados à estas respostas ainda são pouco compreendidos. Em nossos resultados, observamos que tais efeitos durante o período de estresse foram de fato desencadeados por este modelo aversivo. Entretanto, nenhum tratamento provocou alterações significativas na temperatura cutânea da cauda, sugerindo que a neurotransmissão

endocanabinoide no CI não está envolvida na modulação da temperatura caudal durante o estresse agudo por restrição.

O aumento endógeno de 2-AG no CI, atenuou o aumento da PAM e FC durante o estresse agudo. Contudo, o aumento de anandamida, não provocou alterações nas respostas cardiovasculares durante o estresse agudo. Estudos já demonstraram claramente que a inibição das enzimas FAAH e MAGL estimulam o aumento endógeno de anandamida e 2-AG, respectivamente (CRAVATT et al., 2001; LONG et al., 2009; PAN et al., 2009). Dessa forma, nossos dados demonstram que a neurotransmissão endocanabinoide no CI exerce uma influência inibitória sobre a resposta pressora e taquicárdica em situações de estresse agudo, pela mediação de 2-AG, e sugere que o CI faz parte do circuito neural relacionado a neurotransmissão endocanabinoide na modulação das respostas fisiológicas ao estresse. Assim, os resultados do nosso estudo corroboram com a ideia de que a neurotransmissão endocanabinoide desempenha um papel atenuador sobre as respostas fisiológicas evocadas por situações aversivas (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016; MORENA et al., 2016; HARTMANN et al., 2019).

O canabinóide endógeno 2-AG, como já vimos, pode se ligar aos rCB₁ e rCB₂ do sistema endocanabinoide, normalmente, no cérebro encontra-se em concentrações maiores do que a anandamida e atua como agonista completo em rCB₁ (STELLA et al., 1997; PERTWEE., 2015). Apesar disso, a inibição dos rCB₁ em nosso estudo não foi capaz de produzir alterações na resposta pressora ou taquicárdica, sugerindo dessa forma que estes receptores não modulam a atividade cardiovascular durante situações de estresse agudo. Contrariando nossos achados, uma investigação realizada por Gomes de Souza et al. (2016) no núcleo leito da estria terminal (NLET) demonstrou que o aumento endógeno de 2-AG foi capaz de atenuar a resposta taquicárdica pela mediação de rCB₁, contudo, é importante ressaltar que este estudo não foi realizado no córtex insular e, por isso, os mecanismos e as vias pelo qual o 2-AG age na atenuação das respostas cardiovasculares, durante o estresse agudo, podem ser diferentes (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016).

O sistema nervoso autônomo está diretamente envolvido no controle das funções cardiovasculares durante estímulos aversivos, ocorrendo uma ativação simultânea do sistema nervoso simpático e parassimpático cardíaco, durante o estresse agudo por restrição (CARRIVE, 2006; REIS et al., 2014). Portanto, em nosso estudo, é possível que a influência inibitória da neurotransmissão endocanabinóide do CI sobre as respostas pressoras e

taquicárdicas seja mediada pela ativação de vias inibitórias para neurônios simpáticos e/ou pelo aumento de estímulos excitatórios para neurônios parassimpáticos.

Curiosamente, a potencialização da resposta pressora e taquicárdica, causada pelo bloqueio de receptores TRPV₁ no CI demonstrou que estes receptores, além estarem envolvidos na modulação cardiovascular, também exercem um papel inibitório sobre o aumento da PAM e FC durante situações aversivas. A ativação de receptores TRPV₁ pela anandamida é bem conhecida e, por isso, esta substância além de ser considerada um endocanabinóide, também é considerada um endovaniloide (DI MARZO; BISOGNO; DE PETROCELLIS, 2001). Entretanto, fortes evidências nos últimos anos têm demonstrado que o canabinóide endógeno 2-AG é capaz de ativar receptores TRPV₁ (MCVEY et al., 2003; GOLECH et al., 2004; IWASAKI et al., 2008; ZYGMUNT et al., 2013; PETROSINO et al., 2015), essa elucidação corrobora diretamente com nossa investigação, pois, apoia a ideia de que o aumento de 2-AG foi capaz de reduzir os efeitos pressóricos e taquicárdicos, durante o estresse agudo, através da ativação de receptores TRPV₁ e sem envolver rCB₁. Os receptores TRPV₁ são canais catiônicos não seletivos ativados por ligantes que atuam aumentando a permeabilidade aos íons cálcio e, desta forma, agem potencializando a transmissão sináptica (ROSS, 2003; KAWAHARA et al., 2011; CASAROTTO; BORTOLI; ZANGROSSI, 2012; MOREIRA et al., 2012). Logo, o endocanabinóide 2-AG ao ativar receptores TRPV₁ no CI estaria contribuindo para o aumento da transmissão sináptica e atenuando o aumento da PAM e FC durante o estresse agudo. Estudos associam o envolvimento de receptores TRPV₁ principalmente na modulação de respostas fisiológicas desencadeadas por contextos de alto grau de aversividade (MARSCH et al., 2007; TERZIAN et al., 2013), entretanto, estudos que relataram o papel destes receptores na modulação cardiovascular são escassos (TERZIAN et al., 2013).

Os canais TRPV₁ parecem estar principalmente ligados à neurotransmissão glutamatérgica (PALAZZO et al., 2002; XING; LI, 2007), o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC (BENARROCH, 2011), quando ativados os canais TRPV₁ favorecem o aumento da transmissão sináptica glutamatérgica em locais como locus coeruleus, substância cinzenta periquedutal e hipotálamo (SASAMURA et al., 1998; MARINELLI et al., 2002; XING; LI, 2007; STAROWICZ et al., 2007). Estudos já demonstraram que o córtex insular envia numerosas projeções glutamatérgicas ao hipotálamo (SAPER, 1982; YASUI et al., 1991; OPPENHEIMER et al., 1992; TSUMORI et al., 2006; MARINS et al., 2021), área que está diretamente envolvida no controle cardiovascular (SPENCER et al., 1989; ALLEN; CECHETTO, 1992; ALLEN; CECHETTO, 1993) e exerce

forte influência sobre a atividade cardiovascular por meio de projeções diretas para o NTS (ROSS et al.1981; HARDY, 2001; GOTO; SWANSON, 2004). Corroborando com nossa investigação, um estudo realizado por Alves et al. (2009a) demonstrou que receptores NMDA (N-metil D-Aspartato - um tipo de receptor glutamatérgico) presentes no CI medeiam uma influência excitatória desta região sobre o componente parassimpático barorreflexo, uma vez que o antagonismo destes receptores reduziu a resposta de bradicardia barorreflexa (ALVES et al., 2009a). Em conjunto, essas informações sustentam a hipótese de que os receptores TPV₁ ativados por 2-AG poderiam favorecer o aumento da transmissão sináptica glutamatérgica e, assim, aumentariam os estímulos excitatórios da via parassimpática gerando a redução das repostas taquicárdicas e pressóricas desencadeadas pelo estresse.

O canabinóide endógeno 2-AG, como já relatado anteriormente, também é capaz de ativar rCB₂, a maioria da expressão destes receptores ocorre no sistema nervoso periférico e células do sistema imune (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993; DI MARZO; PETROCELLIS, 2012). Entretanto, estudos já demonstraram a presença de rCB₂ em regiões diversas áreas encefálicas como amígdala (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2012), hipocampo (LI; KIM, 2016), tronco cerebral (VAN SICKLE et al., 2005) e córtex (LANCIEGO et al., 2010). Estes receptores estão envolvidos em vários processos neurobiológicos como transmissão sináptica e neuroplasticidade, comportamentos impulsivos, consolidação da memória, ansiedade, abuso de drogas e depressão (ONAIVI et al., 2008; ATWOOD; MACKIE, 2010; BUSQUETS-GARCIA et al., 2011; GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2012; NAVARRETE et al., 2012; LI; KIM, 2016; RATANO et al., 2018). Em um estudo recente realizado por Ratano et al. (2018) foi demonstrado que o aumento do endocanabinoide 2-AG, estimulado pela inibição da enzima MAGL, por tratamento intraperitoneal, facilitou a consolidação da memória durante experiências aversivas (esquiva inibitória por choque nos pés) através da ativação de rCB₂ (RATANO et al., 2018). Contudo, o papel destes receptores no SNC ainda não foi extensamente investigado e existem diversas controvérsias (BUCKLEY, 2008; CÉCYRE et al., 2014), por isso, são necessárias maiores investigações acerca dos locais de expressão de rCB₂, suas funções e mecanismos. Apesar disso, não podemos excluir a possibilidade de que estes receptores também possam mediar os efeitos cardiovasculares, encontrados neste trabalho, ocasionados pelo aumento de 2-AG no CI durante o estresse agudo.

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o principal neurotransmissor inibitório no SNC de mamíferos, atua principalmente aumentando a permeabilidade da membrana aos íons cloreto e bicarbonato através da mediação de receptores ionotrópicos GABA_A (GABA tipo A)

(FARRANT; NUSSER, 2005). Estes são os principais receptores envolvidos na neurotransmissão inibitória do SNC e o canabinóide endógeno 2-AG é capaz de ativá-los (SIGEL et al., 2011; BAKAS et al., 2017). Os receptores GABA_A estão presentes no CI e estão envolvidos em processos como a modulação da dor (POMARES et al., 2019; ALONSO-MATIELO et al., 2021), paladar e memória gustativa (RODRÍGUEZ-GARCÍA; MIRANDA, 2016). Como relatado anteriormente, o CI envia numerosas aferências para o hipotálamo (OPPENHEIMER et al., 1992; GOGOLLA, 2017; MARINS et al., 2021), logo, é possível que receptores GABA_A ativados pelo aumento de 2-AG no CI, reduzam a ativação simpática cardíaca, através de um relé sináptico no hipotálamo, diminuindo as respostas pressoras e taquicárdicas evocadas pelo estresse agudo.

O CI é uma região que apresenta conexões diretas com áreas encefálicas importantes na modulação cardiovascular durante situações de estresse, como córtex pré-frontal medial, hipotálamo e núcleo leito da estria terminal (NLET), indicando que seu envolvimento nas respostas cardiovasculares está associado a modulação de outras regiões encefálicas (GOGOLLA, 2017). Já foi demonstrado que a inibição sináptica geral desta área diminui as respostas pressoras e taquicárdicas sobre a resposta cardiovascular em situações aversivas, ou seja, o CI exerce uma influência pressórica nestes contextos (ALVES et al., 2010). Além disso, também já foi demonstrado que a neurotransmissão noradrenérgica está envolvida na modulação cardiovascular durante o estresse agudo, atuando de maneira pressórica através de receptores α_1 e α_2 (ALVES et al., 2014). Logo, ao modular diferentes tipos de neurotransmissões é possível que sejam desencadeados efeitos diferentes sobre a atividade cardiovascular.

Existem evidências de que a exposição ao estresse altera as concentrações de anandamida e 2-AG em estruturas límbicas, ocorrendo aumento ou diminuição de acordo com o modelo de estresse empregado (PATEL et al., 2004; DUBREUCQ et al., 2012; MCLAUGHLIN et al., 2012; GRAY et al., 2016), bem como observado no estudo de Patel et al. (2004). Eles compararam uma única exposição de roedores ao estresse agudo por restrição (30 minutos) à consecutivas exposições ao mesmo estresse (5 dias por 30 minutos) e demonstraram que a única exposição ao estresse agudo não era capaz de alterar a concentração de anandamida no hipotálamo, mas provocava a redução de 2-AG concomitantemente ao aumento de corticosterona sérica. Todavia, a exposição de 5 dias consecutivos ao estresse agudo provocou o aumento de 2-AG e a atenuação da liberação de corticosterona. Tanto o estresse agudo, quanto as repetidas exposições ao estresse, não provocaram alterações no

conteúdo hipotalâmico de anandamida. Portanto, as respostas fisiológicas ao estresse podem ser moduladas pelo sistema endocanabinoide conforme o tipo de exposição ao contexto aversivo (PATEL et al., 2004). Corroborando com esta ideia, um estudo recente de Newson et al. (2020) verificou que o bloqueio de rCB_1 em ratos expostos ao estresse por alto ruído durante 30 minutos também provocou o aumento da concentração de corticosterona, além de uma maior ativação neuronal de estruturas como o núcleo paraventricular do hipotálamo e o NLET (NEWSON et al., 2020), estruturas estas que apresentam conexões diretas e recíprocas com o CI (GOGOLLA, 2017). Sendo assim, é possível que em situações como o estresse agudo por restrição as concentrações de 2-AG no CI também sejam reduzidas, o que poderia contribuir para as respostas de aumento da PAM e FC durante o estresse.

Apesar da anandamida e 2-AG exercerem influências semelhantes na liberação de neurotransmissores em neurônios pré-sinápticos, acredita-se que possam atuar de maneira tônica e fásica, respectivamente (AHN; MCKINNEY; CRAVATT, 2008; HILL; TASKER, 2012; KATONA; FREUND, 2012). A liberação tônica normalmente ocorre quando existe potenciais de ação de baixa frequência levando à liberação de pequenas quantidades do neurotransmissor de forma contínua; já a liberação fásica ocorre quando existe potenciais de ação de alta frequência de por períodos breves resultando em grande elevação da concentração sináptica do neurotransmissor (ALGER; KIM, 2011; KATONA; FREUND, 2012; MORENA et al., 2016). Assim, no presente estudo, durante o período pré-estresse a anandamida atuaria principalmente para regular a transmissão sináptica basal (tônica), enquanto o aumento de 2-AG atuaria de maneira predominantemente fásica (AHN; MCKINNEY; CRAVATT, 2008; GORZALKA; HILL; HILLARD, 2008; KATONA; FREUND, 2012). Isso poderia justificar o motivo pelo qual ao bloquear os receptores CB_1 e $TRPV_1$ ocorreu o aumento dos parâmetros cardiovasculares no período basal (pré-estresse), já que a estimulação tônica supostamente exercida pela anandamida estaria suprimida pelo bloqueio de ambos receptores. Corroborando com esta ideia, em nosso estudo observamos que o aumento da concentração de anandamida, estimulado pela inibição da enzima FAAH, não causou alterações cardiovasculares tanto no período pré-estresse quanto durante o período de restrição, o que reforça a hipótese de que este canabinóide endógeno poderia atuar de maneira “tônica” e não de maneira “fásica”. Em resumo, nossos resultados demonstram que o sistema endocanabinoide no CI modula as respostas cardiovasculares de maneira inibitória durante o estresse agudo por meio do endocanabinóide 2-AG, independente da ativação de rCB_1 , e os receptores $TRPV_1$ exercem papel inibitório sobre

as respostas pressoras e taquicárdicas durante o estresse agudo, independentemente de anandamida.

8 CONCLUSÃO

A neurotransmissão endocanabinóide no córtex insular modula as respostas pressóricas e taquicárdicas de maneira inibitória por meio do canabinóide endógeno 2-AG, independente da ativação de receptores CB₁, durante o estresse agudo por restrição. Os receptores TRPV₁ também exercem papel inibitório sobre o aumento da PAM e FC durante o estresse agudo, independentemente de anandamida.

REFERÊNCIAS

- AHN, K.; MCKINNEY, M. K.; CRAVATT, B. F. Enzymatic Pathways That Regulate Endocannabinoid Signaling in the Nervous System. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 5, p. 1687-1707, 2008.
- ALEKSANDROV, V. G.; ALEKSANDROVA, N. P. The role of the insular cortex in the control of visceral functions. **Human Physiology**, v. 41, n. 5, p. 553–561, 2015.
- ALGER, B. E.; KIM, J. Supply and demand for endocannabinoids. **Trends In Neurosciences**, v. 34, n. 6, p. 304-315, 2011.
- ALLEN, G. V.; CECHETTO, D. F. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area: I. Descending projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 315, n. 3, p. 313-332, 1992.
- ALLEN, G. V.; CECHETTO, D. F. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area. II. Ascending projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 330, n. 3, p. 421-438, 1993.
- ALONSO-MATIELO, H.; GONÇALVES, E. S.; CAMPOS, M.; OLIVEIRA, V. R. S.; TONIOLO, E. F.; ALVES, A. S.; LEBRUN, I.; ANDRADE, D. C. de; TEIXEIRA, M. J.; BRITTO, L. R.G.. Electrical stimulation of the posterior insula induces mechanical analgesia in a rodent model of neuropathic pain by modulating GABAergic signaling and activity in the pain circuitry. **Brain Research**, v. 1754, p. 147237, 2021.
- ALVES, F. H. F.; CRESTANI, C. C.; CORRÊA, F. M. A. The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Brain Research**, v. 1333, p.57-63, 2010.
- ALVES, F. H. F. et al. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the insular cortex of unanesthetized rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 160, n. 1-2, p. 90-98, 2011.
- ALVES, F. H. F. et. al. N-methyl-d-aspartate receptors in the insular cortex modulate baroreflex in unanesthetized rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 147, n. 1-2, p. 56-63, 2009a.
- ALVES, F. H. F. Insular cortex α 1-adrenoceptors modulate the parasympathetic component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1295, p. 119-126, 2009b.
- ALVES, F. H. F. et al. Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 2300–2307, 2013.
- ALVES, F. H. F. et al. Both α 1- and α 2-adrenoceptors in the Insular Cortex Are Involved in the Cardiovascular Responses to Acute Restraint Stress in Rats. **Plos One**, v. 9, n. 1, p.1-7, 2014.
- ATWOOD, B. K.; MACKIE, K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 467-479, 2010.
- BAKAS, T.; VAN NIEUWENHUIJZEN, P.s.; DEVENISH, S.O.; MCGREGOR, I.s.; ARNOLD, J.C.; CHEBIB, M.. The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABA A receptors. **Pharmacological Research**, v. 119, p. 358-370, maio 2017.

BENARROCH, E. E. NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. **Neurology**, v. 76, n. 20, p. 1750-1757, 2011.

BENARROCH, E. E. The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, p. 988-1001, 1993.

BENARROCH, E. E. Insular cortex: Functional complexity and clinical correlations. **Neurology**, v. 93, n. 21, p. 932-938, 2019.

BLESSING, W. W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2003.

BLESSING, W. W.; REIS, D. J. Evidence that GABA and glycine-like inputs inhibit vasodepressor neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit. **Neuroscience Letters**, v. 37, n. 1, p. 57-62, 1983.

BLESSING, E. M.; STEENKAMP, M. M.; MANZANARES, J.; MARMAR, C. R. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 825-836, 2015.

BRASIL, T. F. S. et al. The dorsomedial hypothalamus is involved in the mediation of autonomic and neuroendocrine responses to restraint stress. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1547, 2020.

BRASIL, T. F. S.; BELÉM-FILHO, I. J. A.; FORTALEZA, E. A. T.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORRÊA, F. o M. A.. The AT-1 Angiotensin Receptor is Involved in the Autonomic and Neuroendocrine Responses to Acute Restraint Stress in Male Rats. **Cellular And Molecular Neurobiology**, p. 1-16, 2021.

BUCKLEY, N. E. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 309-318, 2008.

BURFORD, N. G.; WEBSTER, N. A.; CRUZ-TOPETE, D. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, p. 2150, 2017.

BURNSTOCK, G. et al. Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. **Nature**, v. 200, n. 4906, p. 581-582, 1963.

BUSNARDO, C. et al. Nitroergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 90, p. 16-27, 2019.

BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 158, n. 1-2, p. 51-57, 2010.

BUSQUETS-GARCIA, A. et al. Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 479-486, 2011.

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 2, p. 101-111, 2013.

CANNON, W. B. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement. **Appleton Century Crofts**, 1915.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, v. 33, n. 12, p. 1251-1254, 2006.

CASAROTTO, P. C.; BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 80-88, 2012.

CÉCYRE, B. et al. Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 2, p. 175-184, 2014.

CHOUCHOU, F. et al. How the insula speaks to the heart: Cardiac responses to insular stimulation in humans. **Human Brain Mapping**, v. 40, n. 9, p. 2611–2622, 2019.

COHEN, B. E.; EDMONDSON, D.; KRONISH, I. M. State of the art review: depression, stress, anxiety, and cardiovascular disease. **American journal of hypertension**, v. 28, n. 11, p. 1295-1302, 2015.

COLERIDGE, H. M.; COLERIDGE, J. C. G.; KIDD, C. Role of the pulmonary arterial baroreceptors in the effects produced by capsaicin in the dog. **The Journal of physiology**, v. 170, n. 2, p. 272-285, 1964.

COLOMBARI, E. et al. Role of the medulla oblongata in hypertension. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 549-554, 2001.

CRAVATT, B. F.; DEMAREST, K.; PATRICELLI, M. P.; BRACEY, M. H.; GIANG, D. K.; MARTIN, B. R.; LICHTMAN, A. H. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9371-9376, 2001.

CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p.251, 2016.

CRUZ, F. C. et al. Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. **Journal of psychopharmacology**, v. 26, n. 10, p. 1366–1374, 2012.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–364, 1994.

DAMPNEY, R. A. L. et al. Central mechanisms underlying short-and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 29, n. 4, p. 261-268, 2002.

DEVANE, W.; HANUS, L; BREUER, A.; PERTWEE, R.; STEVENSON, L.; GRIFFIN, G; GIBSON, D; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DHABHAR, F.S. A hassle a day may keep the pathogens away: The fight-or-flight stress response and the augmentation of immune function. **Integrative and Comparative Biology**, v. 49, p. 215–236, 2009a.

DHABHAR, F.S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology. **NeuroImmunoModulation**, v. 16, p. 300–317, 2009b.

DHABHAR, F.S. Effects of stress on immune function: The good, the bad, and the beautiful. **Immunologic Research**, v. 58, p. 193–210, 2014.

DHABHAR, F.S. The short-term stress response – Mother nature’s mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 49, p. 175–192, 2018.

DHABHAR, F. S. The power of positive stress – a complementary commentary. **Stress**, v. 22, n. 5, p. 526-529, 2019.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 2608–2615, 1996.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behavior and Immunity**, v. 11, p. 286–306, 1997.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Bi-directional effects of stress on immune function: possible explanations for salubrious as well as harmful effects. In: **Psychoneuroimmunology**, Two-Volume Set. Elsevier Inc., p. 723-760, 2007.

DHABHAR, F. S.; MALARKEY, W. B.; NERI, E.; MCEWEN, B.S. Stress-induced redistribution of immune cells – From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones. **Psychoneuroendocrinology**, 37, 1345–1368, 2012.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R.L. Effects of stress on immune cell distribution – Dynamics and hormonal mechanisms. **Journal of Immunology**, 154, p. 5511–5527, 1995.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; STEIN, M.; MCEWEN, B. S.; & SPENCER, R.L. Diurnal and stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain, Behavior and Immunology**, v. 8, p. 66–79, 1994.

DI MARZO, V. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 686-691, 1994.

DI MARZO, V.; PETROCELLIS L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? **Philosophical Transactions Royal Society of London B Biological Sciences**, 367:3216-28. 2012.

DUBREUCQ, S. et al. Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 8, p. 1885-1900, 2012.

FARRANT, M.; NUSSER, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of gabaa receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 215-229, 2005.

FOWLER, C. J. Anandamide uptake explained? **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 181-185, 2012.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABAA receptors. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 951-964, 2012.

GELFAND, R.; LAMBERTSEN, C. J. Dynamic respiratory response to abrupt change of inspired CO₂ at normal and high PO₂. **Journal of Applied Physiology**, v. 35, n. 6, p. 903-913, 1973.

GIL-LIEVANA, E. et al. Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory. **Communications biology**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2020.

GINTY, A. T. et al. Cardiovascular and autonomic reactivity to psychological stress: Neurophysiological substrates and links to cardiovascular disease. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 207, p. 2–9, 2017.

GLASS, M; FAULL, R.L.M; DRAGUNOW, M. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. **Neuroscience**, v. 77, n. 2, p. 299-318, 1997.

GOGOLLA, N. The insular cortex. **Current Biology**, v. 27, n. 12, p. R580–R586, 2017.

GOLECH, S. A.; MCCARRON, R. M.; CHEN, Y.; BEMBRY, J.; LENZ, F; MECHOULAM, R.; SHOHAMI, E.; SPATZ, M. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. **Molecular Brain Research**, v. 132, n. 1, p. 87-92, 2004.

GOUVEIA, M. K. et al. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 379–88, 2016.

GOMES-DE-SOUZA, L. et al. Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 19, p. 2833-2844, 2016.

GOMES-DE-SOUZA, L.; COSTA-FERREIRA, W.; MENDONÇA, M. M.; XAVIER, C. H.; CRESTANI, C. C. Lateral hypothalamus involvement in control of stress response by bed nucleus of the stria terminalis endocannabinoid neurotransmission in male rats. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

GORZALKA, B. B.; HILL, M. N.; HILLARD, C. J. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1152-1160, 2008.

GOTO, M.; SWANSON, L. W. Axonal projections from the parasubthalamic nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 469, n. 4, p. 581-607, 2004.

GRAY, J. M. et al. Sustained glucocorticoid exposure recruits cortico-limbic CRH signaling to

- modulate endocannabinoid function. **Psychoneuroendocrinology**, v. 66, p. 151-158, 2016.
- GREEN, B. O. B.; KAVANAGH, D.; YOUNG, R. Being stoned: a review of self-reported cannabis effects. **Drug and alcohol review**, v. 22, n. 4, p. 453-460, 2003.
- GREGUS, A. et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. **Behavioural brain research**, v. 156, n. 1, p. 105-114, 2005.
- GULLETTE, E. C. D. Effects of Mental Stress on Myocardial Ischemia During Daily Life. **Jama: The Journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 19, p. 1521, 1997.
- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.
- GUYENET, P. G.; DARNALL, R. A.; RILEY, T. A. Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 5, p. R1063-R1074, 1990.
- HAN, J. et al. Plasticity-Related PKM ζ Signaling in the Insular Cortex Is Involved in the Modulation of Neuropathic Pain after Nerve Injury. **Neural Plasticity**, p. 1–10, 2015.
- HARDY, S. G. P. Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla. **Brain Research**, v. 894, n. 2, p. 233-240, 2001.
- HARTMANN, A.; FASSINI, A.; SCOPINHO, A.; CORREA, F. M.; GUIMARÃES, F.; LISBOA, S. F.; RESSTEL, L. Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Journal Of Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 606-614, 2019.
- HERKENHAM, M. A. B. L. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the national Academy of sciences**, v. 87, n. 5, p. 1932-1936, 1990.
- HERKENHAM, M.; LYNN, A.; JOHNSON, M.; MELVIN, L.; COSTA, B.; RICE, K. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **The Journal Of Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 563-583, 1991.
- HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. August, p. 1–12, 2013.
- HERRING, N.; KALLA, M.; PATERSON, D. J. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: current concepts and emerging therapies. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 12, p. 707-726, 2019.
- HILL, M. N.; MCEWEN, B. S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 791–797, 2010.
- HILL, M. N.; TASKER, J. G. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuroscience**, v. 204, p. 5-16, 2012.
- HILTON, S. M. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. **The Journal of experimental biology**, v. 100, p. 159–74, 1982.

HOWLETT, A. C. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 68, p. 619-631, 2002.

HOWLETT, A. C.; BIDAUT-RUSSELL, M.; A DEVANE, W.; MELVIN, L.; JOHNSON, M. R.; HERKENHAM, M. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. **Trends In Neurosciences**, v. 13, n. 10, p. 420-423, 1990.

IWASAKI, Y.; SAITO, O.; TANABE, M.; INAYOSHI, K.; KOBATA, K.; UNO, S.; MORITA, A.; WATANABE, T. Monoacylglycerols Activate Capsaicin Receptor, TRPV1. **Lipids**, v. 43, n. 6, p. 471-483, 2008.

JACOBSON, K. A. Tribute to Prof. Geoffrey Burnstock: transition of purinergic signaling to drug discovery. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 1, p. 3-8, 2021.

KAPP, B. S.; SCHWABER, J. S.; DRISCOLL, P. A. The organization of insular cortex projections to the amygdaloid central nucleus and autonomic regulatory nuclei of the dorsal medulla. **Brain research**, v. 360, n. 1-2, p. 355-360, 1985.

KATHURIA, S.; GAETANI, S.; FEGLEY, D.; VALIÑO, F.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; LARANA, G.; CALIGNANO, A. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. **Nature Medicine**, v. 9, n. 1, p. 76-81, 2002.

KATONA, I.; RANCZ, E. A.; ACSÁDY, L.; LEDENT, C.; MACKIE, K.; HÁJOS, N.; FREUND, T. F. Distribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Amygdala and their Role in the Control of GABAergic Transmission. **The Journal Of Neuroscience**, v. 21, n. 23, p. 9506-9518, 2001.

KATONA, I.; SPERLÁGH, B.; SÁK, A.; KÁFALVI, A.; VIZI, E. S.; MACKIE, K.; FREUND, T. F. Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release from Axon Terminals of Specific Hippocampal Interneurons. **The Journal Of Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 4544-4558, 1999.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 529-558, 2012.

KATZ, R. J. Animal models and human depressive disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 231-246, 1981.

KAWAHARA, H.; DREW, G. M.; CHRISTIE, M. J.; VAUGHAN, C. W. Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. **British Journal Of Pharmacology**, v. 163, n. 6, p. 1214-1222, 2011.

KIM, M. J.; TANIOKA, M.; UM, S. W.; HONG, S. K.; LEE, B. H. Analgesic effects of FAAH inhibitor in the insular cortex of nerve-injured rats. **Molecular Pain**, v. 14, p. 174480691881434, 2018.

KIRCHHEIM, H. R. Systemic arterial baroreceptor reflexes. **Physiological reviews**, v. 56, n. 1, p. 100-177, 1976.

KIVIMÄKI, M.; STEPTOE, A. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 4, p. 215-229, 2018.

KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept.

Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 35, n. 5, p. 1291–1301, 2011.

KORTE, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 2, p. 117-142, 2001.

KUBO, T. et al. The lateral septal area is involved in mediation of immobilization stress-induced blood pressure increase in rats. **Neuroscience letters**, v. 318, n. 1, p. 25-28, 2002.

LANCIEGO, J. L.; BARROSO-CHINEA, P.; RICO, A. J.; CONTE-PERALES, L.; CALLÉN, L.; RODA, E.; GÓMEZ-BAUTISTA, V.; LÓPEZ, I. P.; LLUIS, C.; LABANDEIRA-GARCÍA, J. L. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. **Journal Of Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 97-104, 2010.

LAFOURCADE, M.; ELEZGARAI, I.; MATO, S.; BAKIRI, Y.; GRANDES, P.; MANZONI, O. J. Molecular Components and Functions of the Endocannabinoid System in Mouse Prefrontal Cortex. **Plos One**, v. 2, n. 8, p. 709, 2007.

LAGATTA, D. C.; KUNTZE, L. B.; FERREIRA-JUNIOR, N. C.; RESSTEL, L. B. M. Medial prefrontal cortex TRPV1 and CB1 receptors modulate cardiac baroreflex activity by regulating the NMDA receptor/nitric oxide pathway. **Pflügers Archiv - European Journal Of Physiology**, v. 470, n. 10, p. 1521-1542, 2018.

LANGLEY, J. N. *The Autonomic Nervous System: Part 1*. **Cambridge: W. Heffer & Sons**, 1921.

LI, Y.; KIM, J. Deletion of CB 2 cannabinoid receptors reduces synaptic transmission and long-term potentiation in the mouse hippocampus. **Hippocampus**, v. 26, n. 3, p. 275-281, 2016.

LISBOA, S. F.; RESSTEL, L. B.M.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. **European Journal Of Pharmacology**, v. 593, n. 1-3, p. 73-78, 2008.

LIU, J.; HAKUCHO, A.; LIU, X.; FUJIMIYA, T. Acute restraint stress provokes sudden cardiac death in normotensive rats and enhances susceptibility to arrhythmogenic effects of adrenaline in spontaneously hypertensive rats. **Legal Medicine**, v. 21, p. 19-28, 2016.

LONG, J. Z.; NOMURA, D. K.; CRAVATT, B. F. Characterization of Monoacylglycerol Lipase Inhibition Reveals Differences in Central and Peripheral Endocannabinoid Metabolism. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 7, p. 744-753, 2009.

MARINELLI, S.; VAUGHAN, C. W.; CHRISTIE, M. J.; CONNOR, M. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus In vitro. **The Journal Of Physiology**, v. 543, n. 2, p. 531-540, 2002.

MARINS, F. R.; LIMBORÇO-FILHO, M.; D'ABREU, B. F.; ALMEIDA, P. W. M.; GAVIOLI, M.; XAVIER, C. H.; OPPENHEIMER, S. M.; GUATIMOSIM, S.; FONTES, M. A. P. Autonomic and cardiovascular consequences resulting from experimental hemorrhagic stroke in the left or right intermediate insular cortex in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 227, p. 102695, 2020.

MARINS, F. R.; LIMBORÇO-FILHO, M.; IDDINGS, J. A.; XAVIER, C. H.; BIANCARDI, V. C.; STERN, J. E.; DIAZ, J. R.; OPPENHEIMER, S. M.; FILOSA, J. A.; FONTES, M. A. P.

Tachycardia evoked from insular stroke in rats is dependent on glutamatergic neurotransmission in the dorsomedial hypothalamus. **European Journal Of Neurology**, v. 28, n. 11, p. 3640-3649, 2021.

MARINS, F. R.; LIMBORÇO-FILHO, M.; XAVIER, C. H.; BIANCARDI, V. C.; VAZ, G. C.; STERN, J. E.; OPPENHEIMER, S. M.; FONTES, M. A. P. Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, v. 43, n. 4, p. 484-493, 2016.

MARISCANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 4213-4225, 1999.

MARSCH, R. et al. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 832-839, 2007.

MARTIN, D. S. et al. Acute stress increases venomotor tone in conscious rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 271, n. 4, p. H1375-H1383, 1996.

MARTINS, D.; TAVARES, I.; MORGADO, C. "Hotheaded": the role of trpv1 in brain functions. **Neuropharmacology**, v. 85, p. 151-157, 2014.

MARZO, V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. **Reviews Of Physiology, Biochemistry And Pharmacology**, p. 1-24, 2006.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 1990.

MATO, S.; PAZOS, A. Influence of age, postmortem delay and freezing storage period on cannabinoid receptor density and functionality in human brain. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 5, p. 716-726, 2004.

MCKLVEEN, J. M. et al. Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. **Biological psychiatry**, v. 74, n. 9, p. 672-679, 2013.

MCLAUGHLIN, R. J. et al. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. **European neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 9, p. 664-671, 2012.

MCVEY, D. C.; SCHMID, P. C.; SCHMID, H. H. O.; VIGNA, S. R. Endocannabinoids Induce Ileitis in Rats via the Capsaicin Receptor (VR1). **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 2, p. 713-722, 2003.

MECHOULAM, R. Marijuana chemistry. **Science**, v. 168, n. 3936, p. 1159-1166, 1970.

MÉNDEZ-RUETTE, M.; LINSAMBARTH, S.; MORAGA-AMARO, R.; QUINTANA-DONOSO, D.; MÉNDEZ, L.; TAMBURINI, G.; CORNEJO, F.; TORRES, Rodrigo F.; STEHBERG, J. The Role of the Rodent Insula in Anxiety. **Frontiers In Physiology**, v. 10, p. 1-10, 2019.

MESULAM, M. M.; MUFSON, E. J. The Insula of Reil in Man and Monkey. In: Peters A.,

Jones E.G. (eds) **Association and Auditory Cortices. Cerebral Cortex**, v. 4. Boston: Springer, 1985.

MOLDRICH, G.; WENGER, T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. **Peptides**, v. 21, n. 11, p. 1735-1742, 2000.

MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; TERZIAN, A.L.B.; GUIMARÃES, F.s.; WOTJAK, C.T. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety—two sides of one coin? **Neuroscience**, v. 204, p. 186-192, 2012.

MORENA, M. et al. Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80–102, 2016.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

MUTSCHLER, I. et al. Pain and emotion in the insular cortex: Evidence for functional reorganization in major depression. **Neuroscience Letters**, v. 520, n. 2, p. 204–209, 2012.

NAKAMURA, K. Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. **Temperature**, v. 2, n. 3, p. 352-361, 2015.

NALIVAIKO, E. Animal models of psychogenic cardiovascular disorders: what we can learn from them and what we cannot. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 2, p. 115–125, 2011.

NASIMI, A.; SHAFEI, M. N.; ALAEI, H. Glutamate injection into the cuneiform nucleus in rat, produces correlated single unit activities in the Kolliker-Fuse nucleus and cardiovascular responses. **Neuroscience**, v. 223, p. 439-446, 2012.

NAVARRETE, F.; PÉREZ-ORTIZ, J. M.; MANZANARES, J.. Cannabinoid CB2 receptor-mediated regulation of impulsive-like behaviour in DBA/2 mice. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 260-273, 2012.

NEAFSEY, E. J.; HURLEY-GIUS, K. M.; ARVANITIS, D. The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus. **Brain research**, v. 377, n. 2, p. 261-270, 1986.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M.. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NEWSOM, R.J.; GARCIA, R.J.; STAFFORD, J.; OSTERLUND, C.; O'NEILL, C.e.; DAY, H.e.W.; CAMPEAU, S. Remote CB1 receptor antagonist administration reveals multiple sites of tonic and phasic endocannabinoid neuroendocrine regulation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 113, p. 104549, 2020.

NILSSON, S. Comparative anatomy of the autonomic nervous system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 165, n. 1, p. 3–9, 2011.

NOMURA, D. K; BLANKMAN, J. L; SIMON, G. M; FUJIOKA, K.; ISSA, R.; WARD, A. M.; CRAVATT, B. F.; CASIDA, J. Activation of the endocannabinoid system by organophosphorus nerve agents. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 6, p. 373-378, 2008.

NOSAKA, S. Modifications of Arterial Baroreflexes: Obligatory Roles in Cardiovascular Regulation in Stress and Poststress Recovery. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 46, n. 4, p. 271–288, 1996.

O'BRIEN, L. D.; STICHT, M. A.; MITCHNICK, K. A.; LIMEBEER, C. L.; PARKER, L. A.; WINTERS, B. D. CB1 receptor antagonism in the granular insular cortex or somatosensory area facilitates consolidation of object recognition memory. **Neuroscience Letters**, v. 578, p. 192-196, 2014.

ONAIWI, E. S. et al. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. **PLoS one**, v. 3, n. 2, p. e1640, 2008.

OPPENHEIMER, S. M.; CECHETTO, D. F. Cardiac chronotropic organization of the rat insular cortex. **Brain research**, v. 533, n. 1, p. 66-72, 1990.

OPPENHEIMER, S.; CECHETTO, D. The Insular Cortex and the Regulation of Cardiac Function. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., v. 6, p. 1081–1133, 2016.

PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 389–462, 2006.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 325–330, 2000.

PALAZZO, E.; NOVELLIS, V.; MARABESE, I.; CUOMO, D.; ROSSI, F.; BERRINO, L.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **European Journal Of Pharmacology**, v. 439, n. 1-3, p. 69-75, 2002.

PAN, B. et al. Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo [d][1, 3] dioxol-5-yl (hydroxy) methyl) piperidine-1-carboxylate (JZL184) Enhances retrograde endocannabinoid signaling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 331, n. 2, p. 591-597, 2009.

PATEL, S.; ROELKE, C. T.; RADEMACHER, D. J.; CULLINAN, W. E.; HILLARD, C. J. Endocannabinoid Signaling Negatively Modulates Stress-Induced Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5431-5438, 2004.

PAXINOS; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. New York.: Academic Press, 1997.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition**. Elsevier, 2006.

PERTWEE, R. G. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 4, p. 588–631, 2010.

PERTWEE, R. G. Endocannabinoids and their pharmacological actions. **Endocannabinoids**, p. 1-37, 2015.

PETROCELLIS, L.; MARZO, V. Non-CB1, Non-CB2 Receptors for Endocannabinoids, Plant

Cannabinoids, and Synthetic Cannabimimetics: focus on g-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. **Journal Of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 103-121, 2009.

PETROSINO, S.; MORIELLO, A. S.; CERRATO, S.; FUSCO, M.; PUIGDEMONT, A.; PETROCELLIS, L.; MARZO, V. The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels. **British Journal Of Pharmacology**, v. 173, n. 7, p. 1154-1162, 2015.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873-884, 2003.

POMARES, F. B.; ROY, S.; FUNCK, T.; FEIER, N. A.; THIEL, A.; FITZCHARLES, M. A.; SCHWEINHARDT, P. Upregulation of cortical GABAA receptor concentration in fibromyalgia. **Pain**, v. 161, n. 1, p. 74-82, 2019.

PUENTE, Nagore; ELEZGARAI, Izaskun; LAFOURCADE, Mathieu; REGUERO, Leire; MARSICANO, G.; GEORGES, F.; MANZONI, O. J.; GRANDES, P. Localization and Function of the Cannabinoid CB1 Receptor in the Anterolateral Bed Nucleus of the Stria Terminalis. **Plos One**, v. 5, n. 1, p. 8869, 2010.

RAMIKIE, T. S.; NYILAS, R.; BLUETT, R. J.; GAMBLE-GEORGE, J. C.; HARTLEY, N. D.; MACKIE, K.; WATANABE, M.; KATONA, I.; PATEL, S. Multiple Mechanistically Distinct Modes of Endocannabinoid Mobilization at Central Amygdala Glutamatergic Synapses. **Neuron**, v. 81, n. 5, p. 1111-1125, 2014.

RATANO, P.; PETRELLA, C.; FORTI, F.; PASSERI, P. P.; MORENA, M.; PALMERY, M.; TREZZA, V.; SEVERINI, C.; CAMPOLONGO, P. Pharmacological inhibition of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis enhances memory consolidation in rats through CB2 receptor activation and mTOR signaling modulation. **Neuropharmacology**, v. 138, p. 210-218, 2018.

REIS, D. G.; FORTALEZA, E. A. T.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress**, v. 17, n. 4, p. 362-372, 2014.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, G.; MIRANDA, M. I. Opposing Roles of Cholinergic and GABAergic Activity in the Insular Cortex and Nucleus Basalis Magnocellularis during Novel Recognition and Familiar Taste Memory Retrieval. **The Journal Of Neuroscience**, v. 36, n. 6, p. 1879-1889, 2016.

ROSS, C. A.; RUGGIERO, D. A.; REIS, D. J. Afferent projections to cardiovascular portions of the nucleus of the tractus solitarius in the rat. **Brain research**, v. 223, n. 2, p. 402-408, 1981.

ROSS, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. **British journal of pharmacology**, v. 140, n. 5, p. 790-801, 2003.

RUGGIERO, D. A.; MRAOVITCH, S.; GRANATA, A. R.; ANWAR, M.; REIS, D. J. A role of insular cortex in cardiovascular function. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 257, n. 2, p. 189-207, 1987.

SALMAN, I. M. Major Autonomic Neuroregulatory Pathways Underlying Short- and Long-Term Control of Cardiovascular Function. **Current Hypertension Reports**, v. 18, n. 3, p. 1-18, 2016.

- SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract. **British Journal Of Pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 212-227, 2018.
- SAPER, C. B. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 210, n. 2, p. 163-173, 1982.
- SAPER, C. B.; STORNETTA, R. L. Central Autonomic System. In: **The Rat Nervous System**, Elsevier, p. 629–673, 2015.
- SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Preparative Actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.
- SASAMURA, T. et al. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. **Neuroreport**, v. 9, n. 9, p. 2045-2048, 1998.
- SCIOLINO, N. R.; ZHOU, W.; HOHMANN, A. G.. Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 3, p. 226-234, 2011.
- SCHADT, J. C.; HASSER, E. M. Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 3, p. R814–R821, 1998.
- SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **The American Journal of Medicine**, v. 10, n. 5, p. 549-555, 1951.
- SIGEL, E.; BAUR, R.; RACZ, I.; MARAZZI, J.; SMART, T. G.; ZIMMER, A.; GERTSCH, J.. The major central endocannabinoid directly acts at GABAA receptors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 44, p. 18150-18155, 2011.
- SILVA-CARDOSO, G. K.; LAZARINI-LOPES, W.; HALLAK, J. E.; CRIPPA, J. A.; ZUARDI, A. W.; GARCIA-CAIRASCO, N.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: possible role of cb1 and trpv1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 197, p. 108712, 2021.
- SHI, T. Y. et al. Kainate receptor mediated presynaptic LTP in agranular insular cortex contributes to fear and anxiety in mice. **Neuropharmacology**, v. 128, p. 388–400, 2018.
- SHIPLEY, M. T. Insular cortex projection to the nucleus of the solitary tract and brainstem visceromotor regions in the mouse. **Brain research bulletin**, v. 8, n. 2, p. 139-148, 1982.
- SMITH, J. K.; BARRON, K. W. The rostral and caudal ventrolateral medulla in young spontaneously hypertensive rats. **Brain research**, v. 506, n. 1, p. 153-158, 1990.
- SPENCER, S. E.; SAWYER, W. B.; LOEWY, A. D.. Cardiovascular effects produced by L-glutamate stimulation of the lateral hypothalamic area. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, v. 257, n. 2, p. 540-552, 1989.
- SPRENGELMEYER, R. et al. The insular cortex and the neuroanatomy of major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 133, n. 1–2, p. 120–127, 2011.

STAROWICZ, K.; MAIONE, S.; CRISTINO, L.; PALAZZO, E.; MARABESE, I.; ROSSI, F.; NOVELLIS, V. de; MARZO, V. di. Tonic Endovanilloid Facilitation of Glutamate Release in Brainstem Descending Antinociceptive Pathways. **Journal Of Neuroscience**, v. 27, n. 50, p. 13739-13749, 2007.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 773-778, 1997.

STICHT, M. A.; LIMEBEER, C. L.; RAFLA, B. R.; ABDULLAH, R. A.; POKLIS, J. L.; HO, W.; NIPHAKIS, M. J.; CRAVATT, B. F.; SHARKEY, K. A.; LICHTMAN, A. H. Endocannabinoid regulation of nausea is mediated by 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the rat visceral insular cortex. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 92-102, 2016.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K.. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 215, n. 1, p. 89-97, 1995.

TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 143, n. 1, p. 231-240, 2006.

TAN, C. L.; KNIGHT, Z. A. Regulation of body temperature by the nervous system. **Neuron**, v. 98, n. 1, p. 31-48, 2018.

TERZIAN, A. L. B.; REIS, D. G.; GUIMARÃES, F. S.; CORRÊA, F. M. A.; RESSTEL, L. B. M.. Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 1, p. 149-157, 2013.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Advances In Physiology Education**, v. 35, n. 1, p. 28-32, 2011.

THORÉN, P. Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 86**, p. 1-94, 1979.

TSAGARELI, N.; TSIKLAURI, N.; KVACHADZE, I.; TSAGARELI, M. G. Endogenous opioid and cannabinoid systems contribute to antinociception produced by administration of NSAIDs into the insular cortex of rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110722, 2020.

TSUMORI, T.; YOKOTA, S.; QIN, Yi; OKA, T.; YASUI, Y. A light and electron microscopic analysis of the convergent insular cortical and amygdaloid projections to the posterior lateral hypothalamus in the rat, with special reference to cardiovascular function. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 3, p. 261-269, 2006.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397-409, 2009.

VAN SICKLE, M. D. et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 329-332, 2005.

VERBERNE, A. J. M.; OWENS, N. C. Cortical modulation of the cardiovascular system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 2, p. 149-168, 1998.

VIANA, T. G.; BASTOS, J. R.; COSTA, R. B.; HOTT, S. C.; MANSUR, F. S.; COIMBRA, C. C.; RESSTEL, L. B.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A. Hypothalamic endocannabinoid signalling modulates aversive responses related to panic attacks. **Neuropharmacology**, v. 148, p. 284-290, 2019.

VIANNA, D. M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2505-2512, 2005.

WADE, J. G. et al. Effect of carotid endarterectomy on carotid chemoreceptor and baroreceptor function in man. **New England Journal of Medicine**, v. 282, n. 15, p. 823-829, 1970.

WIDDICOMBE, J. G. Autonomic Regulation. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 158, n. 2, p. 171-175, 1998.

XING, J.; LI, J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. **Journal of neurophysiology**, v. 97, n. 1, p. 503-511, 2007.

YASUI, Y. et al. Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 303, n. 3, p. 355–374, 1991.

YOSHINO, K. et al. Closed-loop analysis of cardiovascular variability in rats under restraint stress. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 119, n. 1, p. 61–66, 2005.

ZYGMUNT, P. M.; ERMUND, A.; MOVAHED, P.; ANDERSSON, D. A.; SIMONSEN, C.; JÖNSSON, B. A. G.; BLOMGREN, A.; BIRNIR, B.; BEVAN, S.; ESCHALIER, A. Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A Link between Phospholipase C and TRPV1. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 81618-81618, 2013.

Role of endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex on cardiovascular and autonomic responses triggered by acute restriction stress

Ana C. **Godoy**¹,IVALDO J.A. **Belém-Filho**², Cristiane **Busnardo**²,
Carlos C. **Crestani**³, Melissa T. **Goulart**¹,
Fernando M.A. **Correa**², Fernando H.F. **Alves**¹

1 Department of Health Sciences, Faculty of Medicine – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil

2 Departments of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

3 Department of Drugs and Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil

Running title: Insular cortex modulate cardiovascular responses during stress.

* **Corresponding author:** Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves, Department of Health Sciences, Faculty of Medicine – Federal University of Lavras, Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Phone: +55 35992224091

E-mail address: fernando.ferrari@ufla.br

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Some data may not be made available because of privacy or ethical restrictions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledgement Ivanilda Fortunato for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding information

The present research was supported by grants from FAPESP (grant # 2015/05922-9 and 2017/19249-0) and CAPES (process # 88887.505600/2020-00).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Godoy: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft preparation, Visualization. **Belém-Filho:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **Busnardo:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **Crestani:** Methodology, Formal analysis, Resources. **Goulart:** Methodology, Formal analysis. **Correa:** Methodology, Formal analysis, Resources. **Alves:** Conceptualization, Methodology, Resources, Data Curation, Writing – review and editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Ethical Committee - Experimental procedures were carried out following protocols approved by the Ethical Committee for Use of Animals of the Federal University of Lavras (Approval #053/19), which complies with Brazilian and international guidelines for animal use and welfare

Bullet point summary**What is already known?**

- The insular cortex modulates the cardiovascular responses to restraint stress.
- The endocannabinoid neurotransmission into insular cortex modulates the pain sensitivity and memory consolidation in aversive contexts.

What this study adds?

- Antagonism of TRPV1 receptors within the IC potentiated increases in blood pressure and heart rate during restraint stress.
- Attenuation of the increase in tachycardia and mean arterial pressure evoked by restraint stress after inhibition of monoacylglycerol lipase (MAGL).

Clinical significance

- The investigation of the brain areas and neurotransmitter systems involved during stressful situations may contribute to the development of more effective therapeutic strategies for reducing the damage caused by stress.

ABSTRACT

Background and Purpose: The insular cortex (IC) is a brain structure directly involved in the control of cardiovascular and autonomic processes during aversive situations. Modulation of these processes can be performed through different neurotransmission systems, such as the endocannabinoid system. This neurotransmission is closely related to the control of autonomic responses in aversive scenarios. Thus, the aim of this study was to investigate the role of endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex on cardiovascular and autonomic responses during acute restraint stress.

Experimental Approach: CB1 receptor antagonist AM251 (0,1 nmol/100nL), TRPV1 receptor antagonist capsazepine (15 nmol/100nL), the FAAH enzyme inhibitor URB597 (0,01 nmol/100nL) and the MAGL enzyme inhibitor JZL184 (5 nmol/100nL) were microinjected into the IC 10 min before the onset of restraint stress.

Key Results: TRPV1 receptor antagonism within the IC potentiated the blood pressure and tachycardic responses evoked by acute stress. MAGL enzyme inhibition reduced the blood pressure increase and tachycardia triggered by acute stress. Blockade of CB1 receptors did not modify cardiovascular parameters during the restriction period. Inhibition of the FAAH enzyme did not affect the increase in blood pressure and heart rate during the stress period. No treatment caused significant changes in tail skin temperature.

Conclusion and Implications: Our findings provide evidence that endocannabinoid neurotransmission in the IC modulates pressure and tachycardia responses in an inhibitory manner via the endogenous cannabinoid 2-AG, independent of CB1 receptor activation, during acute restriction stress. TRPV1 receptors play an inhibitory role on the increase in mean arterial pressure and heart rate during acute stress, independent of anandamide.

Keywords: Insular cortex; Restraint stress; 2-AG; TRPV1.

Abbreviations

blood pressure (BP); insular cortex (IC); anandamide (AEA); 2-arachyloilglycerol (2-AG); monoacylglycerol lipase (MAGL); fatty acid amide hydrolase (FAAH); cannabinoid receptor type 1 (rCB1); cannabinoid receptor type 2 (rCB2); vanilloid receptor of transitory potential subtype 1 (TRPV1); artificial cerebrospinal fluid (aCSF); mean arterial pressure (MAP); heart rate (HR); tail skin temperature (CT); restraint stress (RS);

INTRODUCTION

Stressful situations are recurrent throughout life and exposure to psychological stress is closely related to the development of psychiatric disorders and cardiovascular diseases (Gullette et al., 1997; Cohen et al., 2015; Liu et al. 2016; Kivimäki & Steptoe, 2018). In acute stress situations, the sympathetic nervous system initiates cardiovascular adjustments, stimulating increased blood pressure and heart rate. In these contexts, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is also activated promoting physiological adjustments by the secretion of glucocorticoids and enables the proper functioning of the organism in the face of real or perceived threat (Hilton, 1982; Schadt & Hasser, 1998; Yasui et al., 1991; Chouchou et al., 2019).

Restriction stress in rats is an unavoidable acute psychological stress model used to investigate behavioral (Campos et al., 2013), endocrine and cardiovascular changes, capable of causing intense and sustained increases in heart rate, blood pressure and the reduction of tail temperature (Blessing, 2003; Vianna & Carrive, 2005; Gomes-de-Souza et al., 2016; Busnardo et al., 2019; Brasil et al., 2020). Cardiovascular activity is modulated by several encephalic structures, among them, the insular cortex (Oppenheimer & Cechetto, 1990; Dampney, 1994; Alves et al., 2010; Alves et al., 2011; Alves et al., 2014; Marins et al., 2016; Marins et al., 2020). This area acts as an integrative center, being essential for sensory and cognitive processing and for the modulation of autonomic functions both in everyday situations and in the face of aversive contexts (Alves et al., 2010; Marins et al., 2016; Oppenheimer & Cechetto, 2016; Gogolla, 2017).

The understanding of physiological responses in stress situations and their neurobiological mechanisms are still not well understood. For many years, evidence has shown that in human populations cannabis consumption provides a reduction in perceived stress, increased feelings of relaxation, and buffering of anxiety symptoms (Green et al., 2003). Since the physiological effects of cannabis are mediated by endocannabinoid receptors, the idea has emerged that

endocannabinoid neurotransmission would be involved in attenuating the effects triggered by stressful situations (Mechoulam, 1970; Devane et al., 1992; Sugiura et al., 1995; Blessing et al., 2015). Supporting this hypothesis, several evidences have shown that endocannabinoid neurotransmission can modulate physiological responses during aversive contexts (Patel et al., 2004; Hartmann et al., 2019; Newson et al., 2020; Gomes-de-Souza et al. 2016; Gomes-de-Souza et al., 2021).

The role of endocannabinoid neurotransmission in the insular cortex on cardiovascular and autonomic responses in acute stress situations still remains unexplored. Thus, the hypothesis of this study is that endocannabinoid neurotransmission present in the insular cortex region is able to modulate cardiovascular and autonomic responses during acute restriction stress in rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The experimental procedures were performed according to the protocol approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Federal University of Lavras (Approval # 053/19), which complies with Brazilian and international guidelines for animal use and welfare. Forty male Wistar rats (weighing 280-320 g) were used in the present study. The animals were obtained from the animal breeding facilities of the Federal University of Lavras (UFLA) (Lavras, MG, Brazil) and kept at the Animal Care Unit of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. The animals were kept at a temperature of $\pm 25^{\circ}\text{C}$, under a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on between 7:00 am and 7:00 pm), had free access to water and standard rat chow.

The use of wistar rats for these experiments is justified by the fact that this species of animal has some characteristics such as: viability, similarities with humans (Leong et al., 2015). In addition, the use of male wistar rats for this experiment was to avoid interference from hormonal

variation throughout the estrogenic cycle of female and autonomic responses during acute stress (Mahmoodzadeh, Fliegner, & Dworatzek, 2013; Miller et al., 2017; Miller et al., 2011).

Surgical procedures

Six days before the experiments, the animals were anesthetized for this surgical procedure with intraperitoneal (i.p.) tribromoethanol at a dose of 250 mg/ kg. The animals were immobilized in a small animal stereotaxic (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA), for local anesthesia the vasoconstrictor lidocaine 2% was injected subcutaneously into the head. The skull cap was exposed through an approximately 1.5 cm skin incision. The periosteum was retracted and removed with 10% H₂O₂. All coordinates for implantation of the cannulas in the IC were determined from the Paxinos & Watson Atlas (Paxinos & Watson, 1997): anteroposterior, +3.2 mm from the bregma; lateral, +3.75 mm from the bregma; vertical, -4.5 mm from the bregma, with a lateral inclination of 0° and incisor = -3.3 mm. With a dental drill, the skull was trepanned for bilateral implantation of the guide cannulas into the IC. These cannulas were made of 24G hypodermic needle segments, 11 mm long and 0.55 mm outer diameter. The cannulas were fixed to the skull with self-curing acrylic resin. Mandrels with 0.2 mm outer diameter and 11 mm length were inserted into the cannulas to avoid eventual obstructions. As a prophylactic measure, after surgery the animals received a veterinary pentabiotic (Fort Dodge, São Paulo, Brazil, 80,000 UI, i.m.) and the non-steroidal anti-inflammatory drug flunixin meglumine (Banamine®, Schering Plough, Brazil, 2.5 mg/kg, s.c.) (Alves et al., 2010). Twenty-four hours before the experiments, the animals were anesthetized with ketamine (Cetamin®, Syntec, Brazil) and xylazine (Xilazin®, Syntec, Brazil) in a solution of 5 ml of 10% ketamine and 1.6 ml of 2% xylazine, at a dose of 0.1 ml/ 100g, intraperitoneal (i.p.). The femoral artery was dissected and a polyethylene catheter, a PE-10 polyethylene segment (4-5 cm) soldered to a PE-50 polyethylene segment (12-13 cm) was introduced up to the lower abdominal aorta. Minutes before the procedure, the catheter was filled with a physiological solution (NaCl 0.9%)

containing anticoagulant (15 U/mL-1 heparin), obstructed with a metal pin, exteriorized in the dorsal region of the animal, and fixed to the skin using a surgical suture. Each animal received 2.5 mg/kg (s.c.) of the nonsteroidal analgesic Flunixin Meglumine (Banamine®, Schering Plough, Brazil) for postoperative analgesia. After surgery, the animals were kept in individual cages and cardiovascular parameters were recorded the next day. On the day of the experiments, microinjections into the IC were randomized in a non-blinded manner (Brazil et al., 2021).

Microinjection of drugs into the insular cortex

Injection needles (12 mm long, 33 G, Small Parts, USA) were connected to a 2 µl syringe (Hamilton Co., Reno, NV, USA) through a polyethylene tube (PE-10) for the microinjection of drugs into the brain. The final volume of microinjection was 100 nL/side (Alves et al., 2013; Han et al., 2015).

Cardiovascular recording

The catheter was connected to a blood pressure transducer (Hewlett Packard, USA) and pulsatile blood pressure was recorded using an HP-7754A amplifier (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) and an acquisition board (Biopac M-100, Goleta, CA, USA) connected to a personal computer. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) values were derived from pulsatile arterial pressure and processed online by AcqKnowledge 3.8.1 software. Basal recording of MAP and HR was performed for ten minutes with the animals still in their home cages (Alves et al., 2010; Brazil et al. 2020).

Restraint stress

The animals were placed in a polyvinyl chloride (PVC) tube (15 cm long and 6.5 cm in diameter, with a flat floor, with 1 cm holes for ventilation in approximately 20% of the tube surface). After 10 minutes of basal recording, the drug or vehicle was injected. After 10 minutes of injection, recording continued with the animal inside the immobilization tube. The restraint session lasted 30 minutes. After the end of the restraint session, the rats were returned to their

home cages. Each animal was subjected to only one restraint session to avoid habituation (Alves et al., 2010, Gomes-de-Souza, Rodrigues, & Crestani, 2020).

Tail skin temperature recording

Tail skin temperature, was recorded using a Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010 thermal camera (Infra Red Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithes Barn Way Swan Valley Northampton, USA) at a distance of 50 cm. The analysis was performed by thermographic analysis software (IRISYS 4000 Series Imager Version 1.0.0.14) and the temperature was represented by color intensity variations. Temperature measurement was performed at 10 points on the animal's tail, and the mean was calculated for each record (Cruz et al., 2012; Gouveia et al., 2016).

Drugs and solutions

Artificial cerebrospinal fluid - aCSF (NaCl 100 mM; Na₃PO₄ 2 mM; KCl 2.5 mM; MgCl₂ 1.0 mM; NaHCO₃ 27 mM; CaCl₂ 2.5 mM; pH=7.4); ketamine (União Química, Brazil) and xylazine (Syntec, Brazil), 2,2,2-tribromoethanol (Sigma, USA) dissolved in saline (0.9% NaCl), Urethane (SIGMA, USA) dissolved in saline (0.9% NaCl), Flunixin Meglumine (Banamine®, Schering Plough, Brazil), Veterinary Pentabiotic (Fort Dodge, São Paulo, Brazil). The drugs AM251 (Tocris, MO, USA); capsaizine (Tocris, MO, USA); URB597 (Tocris, MO, USA) and JZL184 (Tocris, MO, USA) were dissolved in DMSO.

Experimental design

Five days after the stereotactic surgery to implant the guide cannulas, the animals were submitted to femoral artery cannulation surgery and placed in individual boxes for surgical recovery. The next day, the animals were taken in their respective boxes to the experimental room again. Each animal was connected to the blood pressure recording system to record the baseline pulsatile arterial pressure and heart rate for a period of ten minutes, and also three images were captured from the tail of each animal for baseline skin temperature analysis. Then,

central microinjection of drug or vehicle was performed to the animals, 3 more images of tail temperature were captured, and after ten minutes they were submitted to restraint stress. Still connected to the blood pressure recording system, the animal was transferred to the restraint tube, where it remained for 30 minutes. A tail temperature image was captured immediately after the animal entered the restraint tube, then again at ten, twenty, and thirty minutes. The pulsatile arterial pressure and heart rate were recorded throughout the restriction period. At the end of the restriction period, the animals were euthanized, perfused with physiological solution, and then with formalin solution. The brains were removed and stored in jars filled with formalin for later sectioning and analysis of the injection sites.

Histological determination of the microinjection sites

After completion of the experiments, the animals were anesthetized with urethane (1.2 mg/kg, i.p.) and Evans blue dye (1%, 100 nL) was microinjected at the site of drug administration in the brain. Then, the animals were perfuse-fixed (intracardiac 0.9% NaCl followed by 10% formalin), the brains were removed and preserved in 10% buffered formalin solution. Subsequently, the brains were sectioned using a cryostat (CM, Leica, Wetzlar, Germany), the brains were sectioned in 80 μm thick frontal cuts for analysis of the injection sites. The cuts were arranged on slides and then analyzed using the atlas as reference (Paxinos & Watson, 1997).

Data and Statistical analysis

Prism 8.0.1 software (GraphPad, USA) was used to perform the statistical analysis of the data, which were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The baseline ("pre- and post-drug") values of blood pressure, heart rate, and tail skin temperature were compared by Student's t-test, in case of different results, the "post-drug" values were used to normalize the data for subsequent two-way ANOVA. Cardiovascular and tail skin temperature changes were

analyzed using two-way ANOVA (time and treatment) for repeated measures (time), in case of different results ($p < 0.05$) Bonferroni post-test was performed.

RESULTS

Diagrammatic representations of the bilateral microinjection sites of AM251, capsazepine, URB597 and JZL184 into the IC are presented in Fig. 1, 2, 3 and 4.

Basal parameters of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and tail skin temperature (CT) before and after pharmacological treatment of the insular cortex in rats

The effects of all treatments on the baseline parameters of MAP, HR, and CT are presented in Table 1. Bilateral microinjection into the IC of the selective rCB1 antagonist, AM251 (0.1 nmol/100nL), did not alter the baseline values of MAP or CT, however, the baseline values of HR increased. The microinjection with the selective antagonist for TRPV1 receptors, capsazepine (15 nmol/100nL), caused an increase in the baseline values of MAP and HR, but the post-treatment baseline CT did not show any difference. Treatment with the selective MAGL inhibitor, JZL184 (5 nmol/100nL), increased the baseline parameters of MAP and HR, but also did not cause changes in CT. Microinjection with the selective FAAH inhibitor, URB597 (0.01 nmol/100nL), was not able to trigger changes in baseline MAP, HR, or CT values (Table 1).

Effects of microinjection of AM251, capsazepine, URB597 or JZL184 in the insular cortex on cardiovascular and tail skin temperature responses to restraint stress.

AM251 - AM251 (0.1 nmol/100nL) treatment was not able to modify the pressure response (treatment: $p = 0.3442$; $F(1,12) = 0.9699$; time: $p < 0.0001$; $F(40,480) = 9.586$; interaction: $p = 0.5728$; $F(40,480) = 0.9431$), the tachycardic response (treatment: $p = 0.9323$; $F(1,12) = 0.007517$; time: $p < 0.0001$; $F(40,480) = 38$; interaction: $p > 0.9999$; $F(40,480) = 0.3359$) and the

reduction in CT (treatment: $p = 0.4609$; $F(1,13) = 0.5775$; time: $p = 0.0003$; $F(1.910;24.83) = 11.88$; interaction: $p = 0.6364$; $F(6,78) = 0.7177$), triggered by acute stress (Fig. 5).

capsazepine - Capsazepine (15 nmol/100nL) treatment increased the pressure response (treatment: $p = 0.0154$; $F(1,13) = 7.764$; time: $p < 0.0001$; $F(40,520) = 10.59$; interaction: $p = 0.4305$; $F(40,520) = 1.026$) and tachycardic response (treatment: $p = 0.0363$; $F(1,15) = 5.284$; time: $p < 0.0001$; $F(40,600) = 23.08$; interaction: $p = 0.0003$; $F(40,600) = 2.012$) elicited by acute restraint stress, however, CT reduction was not affected (treatment: $p = 0.1063$; $F(1,14) = 2.980$; time: $p = 0.0002$; $F(2.347;32.86) = 10.31$; interaction: $p = 0.7317$; $F(6,84) = 0.5972$) (Fig. 6).

URB597 - URB597 (0.01 nmol/100nL) treatment did not trigger significant modifications in the pressure (treatment: $p = 0.6077$; $F(1,12) = 0.2779$; time: $p < 0.0001$; $F(40,480) = 9.63$; interaction: $p = 0.3049$; $F(40,480) = 1.108$), tachycardic (treatment: $p = 0.6624$; $F(1,12) = 0.2003$; time: $p < 0.0001$; $F(40,480) = 27.46$; interaction: $p = 0.9928$; $F(40,480) = 0.5273$) or CT reduction (treatment: $p = 0.6143$; $F(1,13) = 0.2665$; time: $p < 0.0001$; $F(1.969;25.59) = 20.05$; interaction: $p < 0.0001$; $F(6,78) = 5.544$) responses evoked by acute stress (Fig. 7).

JZL184 - JZL184 (5 nmol/100nL) treatment decreased the pressure response (treatment: $p = 0.0332$; $F(1,11) = 5.918$; time: $p < 0.0001$; $F(40,440) = 5.851$; interaction: $p = 0.0011$; $F(40,440) = 1.894$) and the tachycardic response (treatment: $p = 0.0413$; $F(1,12) = 5.221$; time: $p < 0.0001$; $F(40,480) = 17.67$; interaction: $p < 0.0001$; $F(40,480) = 2.561$) elicited by acute restraint stress, however, the reduction in CT (treatment: $p = 0.0764$; $F(1,13) = 3.705$; time: $p = 0.0006$; $F(2.165;28.14) = 9.428$; interaction: $p = 0.6342$; $F(6,78) = 0.7206$) was unaffected (Fig. 8).

DISCUSSION

The present study investigated the role of the endocannabinoid system, present in the insular cortex, on cardiovascular activity and tail skin temperature of rats submitted to acute restraint stress, through the involvement of rCB1, TRPV1 receptors and the main enzymes involved in

the process of endocannabinoid degradation: FAAH and MAGL. Given the results obtained, this investigation provides the first evidence of the involvement of endocannabinoid neurotransmission present in the IC in the modulation of cardiovascular activity and autonomic modulation in aversive contexts, specifically during acute restriction stress.

The results of our study demonstrated that bilateral microinjection of the selective TRPV1 receptor antagonist, capsazepine, potentiated the increase in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) triggered by acute stress, but did not affect the decrease in TC. Furthermore, endogenous increase of the endocannabinoid 2-AG in the IC region, by inhibition of the enzyme responsible for its degradation, MAGL, attenuated pressure and tachycardic response during restriction stress, without modifications in CT decrease responses. The blockade of rCB1, caused by the administration of AM251, had no effect on the increase in MAP and HR and reduction in CT over the stress period, and the same did not occur when inhibiting the FAAH enzyme, which is mainly responsible for anandamide degradation.

Acute restriction stress is a well-established aversive stimulus model, capable of inducing biochemical, behavioral, and physiological changes related to stress (Campos et al., 2013). This model causes increased MAP, tachycardia and reduced skin temperature in rodents, this usually occurs due to the redirection of blood flow from the animal's extremities, such as paws and tail, to the main organs involved in the "fight or flight" reaction, such as muscles and brain, favoring the elevation of the internal body temperature (Blessing, 2003; Vianna & Carrive, 2005; Gomes-de-souza et al., 2016; Busnardo et al., 2019; Brasil et al., 2020). Although knowledge regarding physiological responses in aversive situations is important, the neurobiological mechanisms associated with these responses are still poorly understood. In our results, we observed that such effects during the stress period were indeed triggered by this aversive model. However, no treatment caused significant changes in tail skin temperature, suggesting that

endocannabinoid neurotransmission in the IC is not involved in the modulation of tail temperature during acute restraint stress.

The endogenous increase of 2-AG in IC, stimulated by MAGL enzyme inhibition, attenuated the increase in MAP and HR during acute stress. However, the increase in anandamide, caused by inhibition of its enzyme FAAH, did not cause changes in cardiovascular responses during acute stress. Studies have already clearly demonstrated that inhibition of FAAH and MAGL enzymes stimulate endogenous increases in anandamide and 2-AG, respectively (Cravatt et al., 2001; Long et al., 2009; Pan et al., 2009). Thus, our data demonstrate that endocannabinoid neurotransmission in the IC exerts an inhibitory influence on the pressor and tachycardic response in acute stress situations by mediating 2-AG, and suggest that the IC is part of the neural circuitry related to endocannabinoid neurotransmission in modulating physiological stress responses. Thus, the results of our study support the idea that endocannabinoid neurotransmission plays an attenuating role on physiological responses evoked by aversive situations (Gomes-de-souza et al., 2016; Morena et al., 2016; Hartmann et al., 2019).

The endogenous cannabinoid 2-AG, as we have seen, can bind to rCB1 and rCB2 of the endocannabinoid system, typically, in the brain it is found in higher concentrations than anandamide and acts as a full agonist on rCB1 (Stella et al., 1997; Pertwee., 2015). Despite this, inhibition of rCB1 in our study was not able to produce changes in the pressor or tachycardic response, thus suggesting that these receptors do not modulate cardiovascular activity during acute stress situations. Contrary to our findings, an investigation by Gomes de Souza et al. (2016) in the bed nucleus of the stria terminalis (NLET) demonstrated that the endogenous increase of 2-AG was able to attenuate the tachycardic response by mediating rCB1, however, it is important to note that this study was not performed in the insular cortex and, therefore, the mechanisms and pathways by which 2-AG acts in attenuating cardiovascular responses, during acute stress, may be different (Gomes-de-souza et al, 2016).

The autonomic nervous system is directly involved in controlling cardiovascular functions during aversive stimuli, with simultaneous activation of the cardiac sympathetic and parasympathetic nervous system occurring during acute restraint stress (Carrive, 2006; Reis et al., 2014). Therefore, in our study, it is possible that the inhibitory influence of IC endocannabinoid neurotransmission on pressor and tachycardia responses is mediated by activation of inhibitory pathways for sympathetic neurons and/or by enhancement of excitatory stimuli for parasympathetic neurons.

Interestingly, the potentiation of the pressor and tachycardic response caused by blockade of TRPV1 receptors in the IC demonstrated that these receptors, besides being involved in cardiovascular modulation, also exert an inhibitory role on the increase in MAP and HR during aversive situations. The activation of TRPV1 receptors by anandamide is well known and, therefore, this substance, besides being considered an endocannabinoid, is also considered an endovanilloid (Di marzo; Bisogno & De petrocellis, 2001). However, strong evidence in recent years has shown that the endogenous cannabinoid 2-AG is able to activate TRPV1 receptors (Mcvey et al., 2003; Golech et al., 2004; Iwasaki et al., 2008; Zygmunt et al., 2013; Petrosino et al, 2015), this elucidation directly corroborates with our investigation, because, it supports the idea that increasing 2-AG was able to reduce the pressure and tachycardic effects, during acute stress, through the activation of TRPV1 receptors and without involving rCB1. TRPV1 receptors are non-selective cation channels activated by ligands that act by increasing the permeability to calcium ions and, thus, act potentiating synaptic transmission (Ross, 2003; Kawahara et al., 2011; Casarotto; Bortoli & Zangrossi, 2012; Moreira et al., 2012). Therefore, the endocannabinoid 2-AG by activating TRPV1 receptors in the IC would be contributing to the increase in synaptic transmission and attenuating the increase in MAP and HR during acute stress. Studies associate the involvement of TRPV1 receptors mainly in modulating physiological responses triggered by high aversivity contexts (Marsch et al., 2007; Terzian et

al., 2013), however, studies reporting the role of these receptors in cardiovascular modulation are scarce (Terzian et al., 2013).

TRPV1 channels seem to be mainly linked to glutamatergic neurotransmission (Palazzo et al., 2002; Xing & Li, 2007), glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the CNS (Benarroch, 2011), when activated TRPV1 channels favor increased glutamatergic synaptic transmission at sites such as locus coeruleus, periaqueductal gray matter and hypothalamus (Sasamura et al., 1998; Marinelli et al., 2002; Xing & Li, 2007; Starowicz et al., 2007). Studies have already demonstrated that the insular cortex sends numerous glutamatergic projections to the hypothalamus (Saper, 1982; Yasui et al., 1991; Oppenheimer et al., 1992; Tsumori et al., 2006; Marins et al., 2021), an area that is directly involved in cardiovascular control (Spencer et al., 1989; Allen & Cechetto, 1992; Allen & Cechetto, 1993) and exerts strong influence on cardiovascular activity through direct projections to the NTS (Ross et al., 1981; Hardy, 2001; Goto & Swanson, 2004). Corroborating with our investigation, a study by Alves et al. (2009a) demonstrated that NMDA receptors (N-methyl D-Aspartate - a type of glutamatergic receptor) present in the IC mediate an excitatory influence of this region on the parasympathetic baroreflex component, since antagonism of these receptors reduced the baroreflex bradycardia response (Alves et al., 2009a). Taken together, this information supports the hypothesis that TRPV1 receptors activated by 2-AG could favor the increase in glutamatergic synaptic transmission and thus increase excitatory stimuli of the parasympathetic pathway generating the reduction of tachycardic and pressure responses triggered by stress.

The endogenous cannabinoid 2-AG, as previously reported, is also able to activate rCB2, most of the expression of these receptors occurs in the peripheral nervous system and immune system cells (Munro; Thomas & Abu-shaar, 1993; Di marzo & Petrocellis, 2012). However, studies have already demonstrated the presence of rCB2 in regions diverse brain areas such as amygdala (García-gutiérrez et al., 2012), hippocampus (Li & Kim, 2016), brainstem (Van sickle

et al., 2005) and cortex (Lanciego et al., 2010). These receptors are involved in various neurobiological processes such as synaptic transmission and neuroplasticity, impulsive behaviors, memory consolidation, anxiety, drug abuse, and depression (Onaivi et al., 2008; Atwood & Mackie, 2010; Busquets-garcia et al., 2011; García-gutiérrez et al., 2012; Navarrete et al., 2012; Li & Kim, 2016; Ratano et al., 2018). In a recent study by Ratano et al. (2018) it was shown that increasing endocannabinoid 2-AG, stimulated by MAGL enzyme inhibition, by intraperitoneal treatment, facilitated memory consolidation during aversive experiences (foot-shock inhibitory avoidance) through activation of rCB2 (Ratano et al., 2018). However, the role of these receptors in the CNS has not yet been extensively investigated and there are several controversies (Buckley, 2008; Cécyre et al., 2014), so further investigations about the sites of rCB2 expression, their functions and mechanisms are needed. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that these receptors may also mediate the cardiovascular effects, found in this work, caused by increased 2-AG in the IC during acute stress.

GABA (gamma-aminobutyric acid) is the main inhibitory neurotransmitter in the mammalian CNS, acting mainly by increasing membrane permeability to chloride and bicarbonate ions through the mediation of ionotropic GABAA (GABA type A) receptors (Farrant & Nusser, 2005). These are the main receptors involved in inhibitory neurotransmission in the CNS and the endogenous cannabinoid 2-AG is able to activate them (Sigel et al., 2011; Bakas et al., 2017). GABAA receptors are present in the IC and are involved in processes such as pain modulation (Pomares et al., 2019; Alonso-matielo et al., 2021), taste and taste memory (Rodríguez-garcía & Miranda, 2016). As previously reported, the IC sends numerous afferents to the hypothalamus (Oppenheimer et al., 1992; Gogolla, 2017; Marins et al., 2021), therefore, it is possible that GABAA receptors activated by increased 2-AG in the IC, reduce cardiac sympathetic activation, through a synaptic relay in the hypothalamus, decreasing the pressor and tachycardic responses evoked by acute stress.

The IC is a region that presents direct connections with encephalic areas important in cardiovascular modulation during stress situations, such as medial prefrontal cortex, hypothalamus, and bed nucleus striatum terminalis (NLET), indicating that its involvement in cardiovascular responses is associated with modulation of other encephalic regions (Gogolla, 2017). It has already been shown that general synaptic inhibition of this area decreases pressor and tachycardia responses on the cardiovascular response in aversive situations, i.e., the IC exerts a pressor influence in these contexts (Alves et al., 2010). Moreover, it has also been shown that noradrenergic neurotransmission is involved in cardiovascular modulation during acute stress, acting in a pressor manner through $\alpha 1$ and $\alpha 2$ receptors (Alves et al., 2014). Therefore, by modulating different types of neurotransmission it is possible that different effects are triggered on cardiovascular activity.

There is evidence that stress exposure alters anandamide and 2-AG concentrations in limbic structures, with increases or decreases occurring according to the stress model employed (Patel et al., 2004; Dubreucq et al., 2012; Mclaughlin et al., 2012; Gray et al., 2016), as well as observed in the study by Patel et al. (2004). They compared a single exposure of rodents to acute restraint stress (30 minutes) to consecutive exposures to the same stress (5 days for 30 minutes) and demonstrated that the single exposure to acute stress was not able to alter anandamide concentration in the hypothalamus, but caused a reduction in 2-AG concomitant with an increase in serum corticosterone. However, exposure for 5 consecutive days to acute stress caused an increase in 2-AG and attenuation of corticosterone release. Both acute stress and repeated stress exposures did not cause changes in hypothalamic anandamide content. Therefore, physiological responses to stress may be modulated by the endocannabinoid system according to the type of exposure to the aversive context (Patel et al., 2004). Corroborating this idea, a recent study by Newson et al. (2020) found that the blockade of rCB1 in rats exposed to high noise stress for 30 minutes also caused an increase in corticosterone concentration, in

addition to a greater neuronal activation of structures such as the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the NLET (Newson et al., 2020), structures that have direct and reciprocal connections with the IC (Gogolla, 2017). Thus, it is possible that in situations such as acute restriction stress, 2-AG concentrations in the IC are also reduced, which could contribute to the increased MAP and HR responses during stress.

Although anandamide and 2-AG exert similar influences on neurotransmitter release in presynaptic neurons, it is believed that they may act in a tonic and phasic manner, respectively (Ahn; McKinney & Cravatt, 2008; Hill & Tasker, 2012; Katona & Freund, 2012). Tonic release normally occurs when there are low-frequency action potentials leading to the release of small amounts of the neurotransmitter continuously, whereas phasic release occurs when there are high-frequency action potentials for brief periods resulting in a large elevation of the synaptic concentration of the neurotransmitter (Alger & Kim, 2011; Katona & Freund, 2012; Morena et al., 2016). Thus, in the present study, during the pre-stress period anandamide would act mainly to regulate basal (tonic) synaptic transmission, while increased 2-AG would act in a predominantly phasic manner (Ahn; McKinney & Cravatt, 2008; Gorzalka; Hill & Hillard, 2008; Katona & Freund, 2012). This could justify the reason why by blocking CB1 and TRPV1 receptors there was an increase in cardiovascular parameters in the basal period (pre-stress), since the tonic stimulation supposedly exerted by anandamide would be suppressed by blocking both receptors. Corroborating this idea, in our study we observed that the increased concentration of anandamide, stimulated by inhibition of FAAH enzyme, did not cause cardiovascular changes both in the pre-stress period and during the restriction period, which reinforces the hypothesis that this endogenous cannabinoid could act in a "tonic" and not in a "phasic" manner. In summary, our results demonstrate that the endocannabinoid system in the IC modulates cardiovascular responses in an inhibitory manner during acute stress through the endocannabinoid 2-AG, independent of rCB1 activation, and TRPV1 receptors exert an

inhibitory role on pressor and tachycardic responses during acute stress, independent of anandamide.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge Ivanilda Fortunato for technical assistance.

Funding information

The present research was supported by grants from FAPESP (grant # 2015/05922-9 and 2017/19249-0) and CAPES (process # 88887.505600/2020-00).

REFERENCES

- Ahn, K., McKinney, M. K., & Cravatt, B. F. (2008). Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chemical reviews*, 108(5), 1687-1707. doi.org/10.1021/cr0782067
- Alger, B. E., & Kim, J. (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends in neurosciences*, 34(6), 304-315. doi.org/10.1016/j.tins.2011.03.003
- Allen, G. V., & Cechetto, D. F. (1992). Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area: I. Descending projections. *Journal of Comparative Neurology*, 315(3), 313-332. doi.org/10.1002/cne.903150307
- Allen, G. V., & Cechetto, D. F. (1993). Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area. II. Ascending projections. *Journal of Comparative Neurology*, 330(3), 421-438. doi.org/10.1002/cne.903300310
- Alonso-Matielo, H., Gonçalves, E. S., Campos, M., Oliveira, V. R., Toniolo, E. F., Alves, A. S., ... & Dale, C. S. (2021). Electrical stimulation of the posterior insula induces mechanical analgesia in a rodent model of neuropathic pain by modulating GABAergic signaling and activity in the pain circuitry. *Brain Research*, 1754, 147237.
- Alves, F. H., Crestani, C. C., Resstel, L. B., & Correa, F. M. (2009). N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex modulate baroreflex in unanesthetized rats. *Autonomic Neuroscience*, 147(1-2), 56-63. doi.org/10.1016/j.autneu.2008.12.015
- Alves, F. H., Crestani, C. C., Resstel, L. B., & Correia, F. M. (2014). Both $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenoceptors in the insular cortex are involved in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *PloS one*, 9(1), e83900. doi.org/10.1371/journal.pone.0083900
- Alves, F. H., Crestani, C. C., Resstel, L. B., & Correa, F. M. (2011). Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the insular cortex of unanesthetized rats. *Autonomic Neuroscience*, 160(1-2), 90-98. doi.org/10.1016/j.autneu.2010.11.002
- Alves, F. H., Crestani, C. C., & Corrêa, F. M. (2010). The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Brain research*, 1333, 57-63. doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.077
- Atwood, B. K., & Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *British journal of pharmacology*, 160(3), 467-479. doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x
- Bakas, T., Van Nieuwenhuijzen, P. S., Devenish, S. O., McGregor, I. S., Arnold, J. C., & Chebib, M. (2017). The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. *Pharmacological research*, 119, 358-370. doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.022
- Benarroch, E. E. (2011). NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology*, 76(20), 1750-1757. doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821b7cc9
- Brasil, T. F., Lopes-Azevedo, S., Belém-Filho, I. J., Fortaleza, E. A., Antunes-Rodrigues, J., & Corrêa, F. (2020). The dorsomedial hypothalamus is involved in the mediation of autonomic and

- neuroendocrine responses to restraint stress. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1547. doi.org/10.3389/fphar.2019.01547
- Brasil, T. F., Belem-Filho, I. J., Fortaleza, E. A., Antunes-Rodrigues, J., & Corrêa, F. M. (2021). The AT-1 Angiotensin Receptor is Involved in the Autonomic and Neuroendocrine Responses to Acute Restraint Stress in Male Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-16. doi.org/10.1007/s10571-021-01090-7
- Buckley, N. E. (2008). The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *British journal of pharmacology*, 153(2), 309-318. doi.org/10.1038/sj.bjp.0707527
- Busnardo, C., Crestani, C. C., Scopinho, A. A., Packard, B. A., Resstel, L. B., Correa, F. M., & Herman, J. P. (2019). Nitroergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 90, 16-27. doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.11.001
- Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Pastor, A., De La Torre, R., Maldonado, R., & Ozaita, A. (2011). Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biological psychiatry*, 70(5), 479-486. doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.04.022
- Blessing, W. W. (2003). Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cellular and molecular neurobiology*, 23(4), 527-538. doi.org/10.1023/A:1025020029037
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 35, S101-S111. doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139
- Carrive, P. (2006). Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(12), 1251-1254. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04519.x
- Casarotto, P. C., de Bortoli, V. C., & Zangrossi Jr, H. (2012). Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. *Behavioural Pharmacology*, 23(1), 80-88. doi: 10.1097/FBP.0b013e32834ecb14
- Cécyre, B., Thomas, S., Ptito, M., Casanova, C., & Bouchard, J. F. (2014). Evaluation of the specificity of antibodies raised against cannabinoid receptor type 2 in the mouse retina. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(2), 175-184. doi.org/10.1007/s00210-013-0930-8
- Chouchou, F., Mauguière, F., Vallayer, O., Catenoix, H., Isnard, J., Montavont, A., ... & Mazzola, L. (2019). How the insula speaks to the heart: cardiac responses to insular stimulation in humans. *Human brain mapping*, 40(9), 2611-2622. doi.org/10.1002/hbm.24548
- Cohen, B. E., Edmondson, D., & Kronish, I. M. (2015). State of the art review: depression, stress, anxiety, and cardiovascular disease. *American journal of hypertension*, 28(11), 1295-1302. doi.org/10.1093/ajh/hpv047
- Cruz, F. C., Engi, S. A., Leão, R. M., Planeta, C. S., & Crestani, C. C. (2012). Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. *Journal of Psychopharmacology*, 26(10), 1366-1374. doi.org/10.1177/0269881112453210
- Cravatt, B. F., Demarest, K., Patricelli, M. P., Bracey, M. H., Giang, D. K., Martin, B. R., & Lichtman, A. H. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 9371-9376. doi.org/10.1073/pnas.161191698
- Dampney, R. A. (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiological reviews*. doi.org/10.1152/physrev.1994.74.2.323
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., ... & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949. doi: 10.1126/science.1470919

- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372(6507), 686-691. doi.org/10.1038/372686a0
- Di Marzo, V., & De Petrocellis, L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1607), 3216-3228. doi.org/10.1098/rstb.2011.0382
- Dubreucq, S., Matias, I., Cardinal, P., Häring, M., Lutz, B., Marsicano, G., & Chaouloff, F. (2012). Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice. *Neuropsychopharmacology*, 37(8), 1885-1900. doi.org/10.1038/npp.2012.36
- Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 215-229. doi.org/10.1038/nrn1625
- García-Gutiérrez, M. S., García-Bueno, B., Zoppi, S., Leza, J. C., & Manzanares, J. (2012). Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA receptors. *British journal of pharmacology*, 165(4), 951-964. doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01625.x
- Gogolla, N. (2017). The insular cortex. *Current Biology*, 27(12), R580-R586. doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.010
- Golech, S. A., McCarron, R. M., Chen, Y., Bembry, J., Lenz, F., Mechoulam, R., ... & Spatz, M. (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Molecular Brain Research*, 132(1), 87-92. doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.08.025
- Gomes-de-Souza, L., Oliveira, L. A., Benini, R., Rodella, P., Costa-Ferreira, W., & Crestani, C. C. (2016). Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *British journal of pharmacology*, 173(19), 2833-2844. doi.org/10.1111/bph.13560
- Gomes-de-Souza, L., Costa-Ferreira, W., Mendonça, M. M., Xavier, C. H., & Crestani, C. C. (2021). Lateral hypothalamus involvement in control of stress response by bed nucleus of the stria terminalis endocannabinoid neurotransmission in male rats. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12. doi.org/10.1038/s41598-021-95401-z
- Gorzalka, B. B., Hill, M. N., & Hillard, C. J. (2008). Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1152-1160. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.004
- Goto, M., & Swanson, L. W. (2004). Axonal projections from the parasubthalamic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 469(4), 581-607. doi.org/10.1002/cne.11036
- Gouveia, M. K., Miguel, T. T., Busnardo, C., Scopinho, A. A., Corrêa, F. M., Nunes-de-Souza, R. L., & Crestani, C. C. (2016). Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Neuropharmacology*, 101, 379-388. doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.018
- Gray, J. M., Wilson, C. D., Lee, T. T., Pittman, Q. J., Deussing, J. M., Hillard, C. J., ... & Hill, M. N. (2016). Sustained glucocorticoid exposure recruits cortico-limbic CRH signaling to modulate endocannabinoid function. *Psychoneuroendocrinology*, 66, 151-158. doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.01.004
- Green, B. O. B., Kavanagh, D., & Young, R. (2003). Being stoned: a review of self-reported cannabis effects. *Drug and alcohol review*, 22(4), 453-460. doi.org/10.1080/09595230310001613976
- Gullette, E. C., Blumenthal, J. A., Babyak, M., Jiang, W., Waugh, R. A., Frid, D. J., ... & Krantz, D. S. (1997). Effects of mental stress on myocardial ischemia during daily life. *Jama*, 277(19), 1521-1526.
- Hardy, S. P. (2001). Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla. *Brain research*, 894(2), 233-240. doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02053-4
- Hartmann, A., Fassini, A., Scopinho, A., Correa, F. M., Guimarães, F. S., Lisboa, S. F., & Resstel, L. B. (2019). Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 33(5), 606-614. doi.org/10.1177/0269881119827799

- Hill, M. N., & Tasker, J. G. (2012). Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience*, 204, 5-16. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.030
- Hilton, S. M. (1982). The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *The Journal of experimental biology*, 100(1), 159-174. doi.org/10.1242/jeb.100.1.159
- Iwasaki, Y., Saito, O., Tanabe, M., Inayoshi, K., Kobata, K., Uno, S., ... & Watanabe, T. (2008). Monoacylglycerols activate capsaicin receptor, TRPV1. *Lipids*, 43(6), 471-483. doi.org/10.1007/s11745-008-3182-5
- Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual review of neuroscience*, 35, 529-558. doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150420
- Kawahara, H., Drew, G. M., Christie, M. J., & Vaughan, C. (2011). Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *British journal of pharmacology*, 163(6), 1214-1222. doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01157.x
- Kivimäki, M., & Steptoe, A. (2018). Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 15(4), 215-229. doi.org/10.1038/nrcardio.2017.189
- Lanciego, J. L., Barroso-Chinea, P., Rico, A. J., Conte-Perales, L., Callén, L., Roda, E., ... & Franco, R. (2011). Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *Journal of Psychopharmacology*, 25(1), 97-104. doi.org/10.1177/0269881110367732
- Leong, X. F., Ng, C. Y., & Jaarin, K. (2015). Animal models in cardiovascular research: hypertension and atherosclerosis. *BioMed research international*, 2015. doi.org/10.1155/2015/528757
- Li, Y., & Kim, J. (2016). Deletion of CB 2 cannabinoid receptors reduces synaptic transmission and long-term potentiation in the mouse hippocampus. *Hippocampus*, 26(3), 275-281. doi.org/10.1002/hipo.22558
- Liu, J., Hakucho, A., Liu, X., & Fujimiya, T. (2016). Acute restraint stress provokes sudden cardiac death in normotensive rats and enhances susceptibility to arrhythmogenic effects of adrenaline in spontaneously hypertensive rats. *Legal Medicine*, 21, 19-28. doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.05.003
- Long, J. Z., Nomura, D. K., & Cravatt, B. F. (2009). Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chemistry & biology*, 16(7), 744-753. doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.05.009
- Mahmoodzadeh, S., Fliegner, D., & Dworzatzek, E. (2013). Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen. *Sex and Gender Differences in Pharmacology*, 23-48. doi.org/10.1007/978-3-642-30726-3_2
- Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kössl, M., Holsboer, F., ... & Wotjak, C. T. (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 832-839. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3303-06.2007
- Marinelli, S., Vaughan, C. W., Christie, M. J., & Connor, M. (2002). Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. *The Journal of physiology*, 543(2), 531-540. doi.org/10.1113/jphysiol.2002.022863
- Marins, F. R., Limborço-Filho, M., D'Abreu, B. F., de Almeida, P. W. M., Gavioli, M., Xavier, C. H., ... & Fontes, M. A. P. (2020). Autonomic and cardiovascular consequences resulting from experimental hemorrhagic stroke in the left or right intermediate insular cortex in rats. *Autonomic Neuroscience*, 227, 102695. doi.org/10.1016/j.autneu.2020.102695
- Marins, F. R., Limborço-Filho, M., Iddings, J. A., Xavier, C. H., Biancardi, V. C., Stern, J. E., ... & Peliky Fontes, M. A. (2021). Tachycardia evoked from insular stroke in rats is dependent on glutamatergic neurotransmission in the dorsomedial hypothalamus. *European Journal of Neurology*. doi.org/10.1111/ene.14987
- Marins, F. R., Limborço-Filho, M., Xavier, C. H., Biancardi, V. C., Vaz, G. C., Stern, J. E., ... & Fontes, M. A. P. (2016). Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis

- of the rat posterior insular cortex. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(4), 484-493. doi.org/10.1111/1440-1681.12542
- McLaughlin, R. J., Hill, M. N., Bambico, F. R., Stuhr, K. L., Gobbi, G., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2012). Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *European neuropsychopharmacology*, 22(9), 664-671. doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.01.004
- McVey, D. C., Schmid, P. C., Schmid, H. H., & Vigna, S. R. (2003). Endocannabinoids induce ileitis in rats via the capsaicin receptor (VR1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(2), 713-722. doi.org/10.1124/jpet.102.043893
- Miller, L. R., Marks, C., Becker, J. B., Hurn, P. D., Chen, W. J., Woodruff, T., ... & Clayton, J. A. (2017). Considering sex as a biological variable in preclinical research. *The FASEB Journal*, 31(1), 29-34. doi.org/10.1096/fj.201600781r
- Miller, V. M., Kaplan, J. R., Schork, N. J., Ouyang, P., Berga, S. L., Wenger, N. K., ... & Reckelhoff, J. F. (2011). Strategies and methods to study sex differences in cardiovascular structure and function: a guide for basic scientists. *Biology of sex differences*, 2(1), 1-18. doi.org/10.1186/2042-6410-2-14
- Mechoulam, R. (1970). Marijuana Chemistry: Recent advances in cannabinoid chemistry open the area to more sophisticated biological research. *Science*, 168(3936), 1159-1166. doi: 10.1126/science.168.3936.1159
- Moreira, F. A., Aguiar, D. C., Terzian, A. L. B., Guimaraes, F. S., & Wotjak, C. T. (2012). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety—two sides of one coin?. *Neuroscience*, 204, 186-192. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.046
- Morena, M., Patel, S., Bains, J. S., & Hill, M. N. (2016). Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 80-102. doi.org/10.1038/npp.2015.166
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65. doi.org/10.1038/365061a0
- Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J. M., & Manzanares, J. (2012). Cannabinoid CB2 receptor-mediated regulation of impulsive-like behaviour in DBA/2 mice. *British journal of pharmacology*, 165(1), 260-273. doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01542.x
- Newsom, R. J., Garcia, R. J., Stafford, J., Osterlund, C., O'Neill, C. E., Day, H. E. W., & Campeau, S. (2020). Remote CB1 receptor antagonist administration reveals multiple sites of tonic and phasic endocannabinoid neuroendocrine regulation. *Psychoneuroendocrinology*, 113, 104549. 10.1016/j.psyneuen.2019.104549
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Meozzi, P. A., Myers, L., ... & Uhl, G. R. (2008). Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS one*, 3(2), e1640. doi.org/10.1371/journal.pone.0001640
- Oppenheimer, S. M., & Cechetto, D. F. (1990). Cardiac chronotropic organization of the rat insular cortex. *Brain research*, 533(1), 66-72. doi.org/10.1016/0006-8993(90)91796-J
- Palazzo, E., de Novellis, V., Marabese, I., Cuomo, D., Rossi, F., Berrino, L., ... & Maione, S. (2002). Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. *European journal of pharmacology*, 439(1-3), 69-75. doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01367-5
- Pan, B., Wang, W., Long, J. Z., Sun, D., Hillard, C. J., Cravatt, B. F., & Liu, Q. S. (2009). Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo [d][1, 3] dioxol-5-yl (hydroxy) methyl) piperidine-1-carboxylate (JZL184) Enhances retrograde endocannabinoid signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(2), 591-597. doi.org/10.1124/jpet.109.158162
- Patel, S., Roelke, C. T., Rademacher, D. J., Cullinan, W. E., & Hillard, C. J. (2004). Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 145(12), 5431-5438. doi.org/10.1210/en.2004-0638
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier.

- Pertwee, R. G. (2015). Endocannabinoids and their pharmacological actions. *Endocannabinoids*, 1-37. doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_1
- Petrosino, S., Schiano Moriello, A., Cerrato, S., Fusco, M., Puigdemont, A., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2016). The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels. *British journal of pharmacology*, 173(7), 1154-1162. doi.org/10.1111/bph.13084
- Pomares, F. B., Roy, S., Funck, T., Feier, N. A., Thiel, A., Fitzcharles, M. A., & Schweinhardt, P. (2020). Upregulation of cortical GABAA receptor concentration in fibromyalgia. *Pain*, 161(1), 74. doi:10.1097/j.pain.0000000000001707
- Ratano, P., Petrella, C., Forti, F., Passeri, P. P., Morena, M., Palmery, M., ... & Campolongo, P. (2018). Pharmacological inhibition of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis enhances memory consolidation in rats through CB2 receptor activation and mTOR signaling modulation. *Neuropharmacology*, 138, 210-218.
- Dos Reis, D. G., Fortaleza, E. A. T., Tavares, R. F., & Corrêa, F. M. A. (2014). Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. *Stress*, 17(4), 362-372. doi.org/10.3109/10253890.2014.930429
- Rodríguez-García, G., & Miranda, M. I. (2016). Opposing roles of cholinergic and GABAergic activity in the insular cortex and nucleus basalis magnocellularis during novel recognition and familiar taste memory retrieval. *Journal of Neuroscience*, 36(6), 1879-1889. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2340-15.2016
- Ross, C. A., Ruggiero, D. A., & Reis, D. J. (1981). Afferent projections to cardiovascular portions of the nucleus of the tractus solitarius in the rat. *Brain research*, 223(2), 402-408. doi.org/10.1016/0006-8993(81)91155-0
- Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British journal of pharmacology*, 140(5), 790-801. doi.org/10.1038/sj.bjp.0705467
- Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C., & Kuraishi, Y. (1998). Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport*, 9(9), 2045-2048.
- Schadt, J. C., & Hasser, E. M. (1998). Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(3), R814-R821. doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.3.R814
- Sigel, E., Baur, R., Rácz, I., Marazzi, J., Smart, T. G., Zimmer, A., & Gertsch, J. (2011). The major central endocannabinoid directly acts at GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18150-18155. doi.org/10.1073/pnas.1113444108
- Spencer, S. E., Sawyer, W. B., & Loewy, A. D. (1989). Cardiovascular effects produced by L-glutamate stimulation of the lateral hypothalamic area. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 257(2), H540-H552. doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.2.H540
- Starowicz, K., Maione, S., Cristino, L., Palazzo, E., Marabese, I., Rossi, F., ... & Di Marzo, V. (2007). Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *Journal of Neuroscience*, 27(50), 13739-13749. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3258-07.2007
- Stella, N., Schweitzer, P., & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773-778. doi.org/10.1038/42015
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., ... & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 215(1), 89-97. doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437
- Terzian, A. L. B., dos Reis, D. G., Guimarães, F. S., Corrêa, F. M., & Resstel, L. B. (2014). Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. *Psychopharmacology*, 231(1), 149-157. doi.org/10.1007/s00213-013-3211-9
- Tsumori, T., Yokota, S., Qin, Y., Oka, T., & Yasui, Y. (2006). A light and electron microscopic analysis of the convergent insular cortical and amygdaloid projections to the posterior lateral hypothalamus in the rat, with special reference to cardiovascular function. *Neuroscience research*, 56(3), 261-269. doi.org/10.1016/j.neures.2006.07.005

- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., ... & Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310(5746), 329-332. doi:10.1126/science.1115740
- Vianna, D. M., & Carrive, P. (2005). Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 21(9), 2505-2512. doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x
- Xing, J., & Li, J. (2007). TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *Journal of neurophysiology*, 97(1), 503-511. doi.org/10.1152/jn.01023.2006
- Yasui, Y., Breder, C. D., Safer, C. B., & Cechetto, D. F. (1991). Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 303(3), 355-374. doi.org/10.1002/cne.903030303
- Zygmunt, P. M., Ermund, A., Movahed, P., Andersson, D. A., Simonsen, C., Jönsson, B. A., ... & Högestätt, E. D. (2013). Monoacylglycerols activate TRPV1—a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One*, 8(12), e81618. doi.org/10.1371/journal.pone.0081618

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Diagrammatic representation of the microinjection sites of the selective CB1 receptor antagonist, AM251, into the region of the insular cortex. Diagrammatic representation of the microinjection sites of the selective cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonist, AM251 (0.1 nmol/100nL), figures based on Paxinos and Watson (2006) mouse brain atlas. Abbreviations: cingulate cortex (Cgl), prelimbic cortex (PrL), corpus callosum (CC), orbital cortex (OC), insular cortex (IC).

Figure 2 – Diagrammatic representation of the microinjection sites of the selective vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist, capsazepine, into the region of the insular cortex. Diagrammatic representation of the microinjection sites of the selective vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist, capsazepine, (15 nmol/100nL), figures based on Paxinos and Watson (2006) rat brain atlas. Abbreviations: cingulate cortex (Cgl), prelimbic cortex (PrL), corpus callosum (CC), orbital cortex (OC), insular cortex (IC).

Figure 3 – Diagrammatic representation of the microinjection sites of the selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase (FAAH), URB597, into the region of the insular cortex. Diagrammatic representation of the microinjection sites of the selective fatty acid amide hydrolase inhibitor (FAAH), URB597 (0.01 nmol/100nL), figures based on Paxinos and Watson (2006) rat brain atlas. Abbreviations: cingulate cortex (Cgl), prelimbic cortex (PrL), corpus callosum (CC), orbital cortex (OC), insular cortex (IC).

Figure 4 – Diagrammatic representation of the microinjection sites of the selective monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibitor, JZL184, into the insular cortex region. Diagrammatic representation of the sites of microinjection the selective monoacylglycerol

lipase (MAGL) inhibitor, JZL184 (5 nmol/100nL), figures based on the rat brain atlas Paxinos and Watson (2006). Abbreviations: cingulate cortex (Cgl), prelimbic cortex (PrL), corpus callosum (CC), orbital cortex (OC), insular cortex (IC).

Figure 5 – Variation of mean arterial pressure (Δ MAP), heart rate (Δ HR) and tail skin temperature (Δ Tail Temperature), in animals treated with the selective cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonist, AM251 (0.1 nmol/100nL), subjected to acute stress by restraint. (A) Variation of mean arterial pressure (Δ MAP), (B) heart rate (Δ HR), (C) tail temperature (Δ Tail Temperature) over time in animals subjected to acute restraint stress treated with the selective cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonist, AM251 (0.1 nmol/100nL) (black circles) or with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (white circles). The graphical representation "-10 (minutes)" indicates the ten minutes prior to the onset of restraint stress and instant of injection. At time 0 (minutes) the animals were subjected to acute restraint stress. The circles and triangles represent the mean and the bars represent the standard error of the mean \pm SEM. Two-way ANOVA test for repeated measures was performed. $p < 0.05$.

Figure 6 – Variation in mean arterial pressure (Δ MAP), heart rate (Δ HR) and tail skin temperature (Δ Tail Temperature), in animals treated with the selective vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist, capsazepine (15 nmol/100nL), subjected to acute restraint stress. (A) Variation of mean arterial pressure (Δ MAP), (B) heart rate (Δ HR), (C) tail temperature (Δ Tail Temperature) over time in animals subjected to acute restraint stress treated with the selective vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist, capsazepine (15 nmol/100nL) (black circles) or with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (white circles). The graphical representation "-10 (minutes)" indicates the ten minutes prior to the onset of restraint stress and instant of injection. At time 0 (minutes) the animals were subjected to acute restraint stress. The circles and

rhombuses represent the mean and the bars represent the standard error of the mean \pm SEM. Two-way ANOVA test for repeated measures was performed, followed by Bonferroni post-test in case of significant difference. * indicates difference between the translated and aCSF group, $p < 0.05$.

Figure 7 – Variation of mean arterial pressure (Δ MAP), heart rate (Δ HR) and tail skin temperature (Δ Tail Temperature), in animals treated with the selective fatty acid amide hydrolase inhibitor (FAAH), URB597 (0.01 nmol/100nL), subjected to acute restraint stress. (A) Variation of mean arterial pressure (Δ MAP), (B) heart rate (Δ HR), (C) tail temperature (Δ Tail Temperature) over time in animals undergoing acute restraint stress treated with the selective fatty acid amide hydrolase inhibitor (FAAH), URB597 (0.01 nmol/100nL) (black circles) or with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (white circles). The graphical representation "-10 (minutes)" indicates the ten minutes prior to the onset of restraint stress and instant of injection. At time 0 (minutes) the animals were subjected to acute restraint stress. The circles represent the mean and the bars represent the standard error of the mean \pm SEM. Two-way ANOVA test was performed. $p < 0.05$.

Figure 8 – Variation of mean arterial pressure (Δ MAP), heart rate (Δ HR) and tail skin temperature (Δ Tail Temperature) in animals treated with the selective monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibitor, JZL184 (5 nmol/100nL), subjected to acute restriction stress. (A) Variation of mean arterial pressure (Δ MAP), (B) heart rate (Δ HR), (C) tail temperature (Δ Tail Temperature) over time in animals undergoing acute restraint stress treated with the selective monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibitor, JZL184 (5 nmol/100nL) (black circles) or with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (white circles). The graphical representation "-10 (minutes)" indicates the ten minutes prior to the onset of restraint stress and instant of injection.

At time 0 (minutes) the animals were subjected to acute restraint stress. The circles and triangles represent the mean and the bars represent the standard error of the mean \pm SEM. Two-way ANOVA test for repeated measures was performed, followed by Bonferroni post-test in case of significant difference. * indicates difference between the translated and aCSF group, $p < 0.05$.

TABLE LEGEND

Table 1 – Basal values of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and tail skin temperature (CT) before and after pharmacological treatment of the insular cortex (IC) with the selective rCB1 antagonist, AM251 (0.1 nmol/100nL), the selective TRPV1 receptor antagonist, capsazepine (15 nmol/100nL), the FAAH enzyme inhibitor, URB597 (0.01 nmol/100nL), and the MAGL enzyme inhibitor, JZL184 (5 nmol/100nL). Student's paired t-test results of baseline values of MAP, HR and CT before and after microinjections of artificial cerebrospinal fluid (aCSF), the selective rCB1 antagonist, AM251 (0, 1 nmol/100nL), the selective TRPV1 receptor antagonist, capsazepine (15 nmol/100nL), the FAAH enzyme inhibitor, URB597 (0.01 nmol/100nL), and the MAGL enzyme inhibitor, JZL184 (5 nmol/100nL). Data collected 10 minutes immediately before injection compared to data collected 10 minutes before the onset of stress exposure. CAP: abbreviation for "capsazepine."
* difference $p < 0.05$. Results were expressed as mean and standard error of the mean (SEM).

ATTACHMENTS

Figure 1.

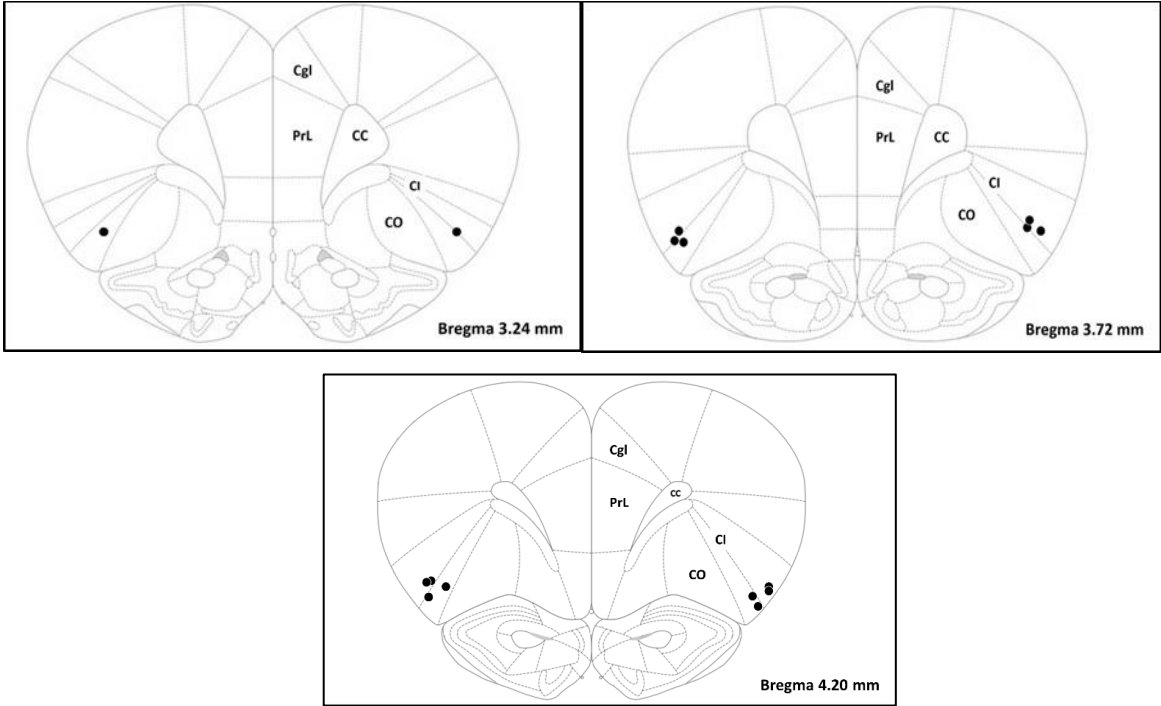


Figure 2.

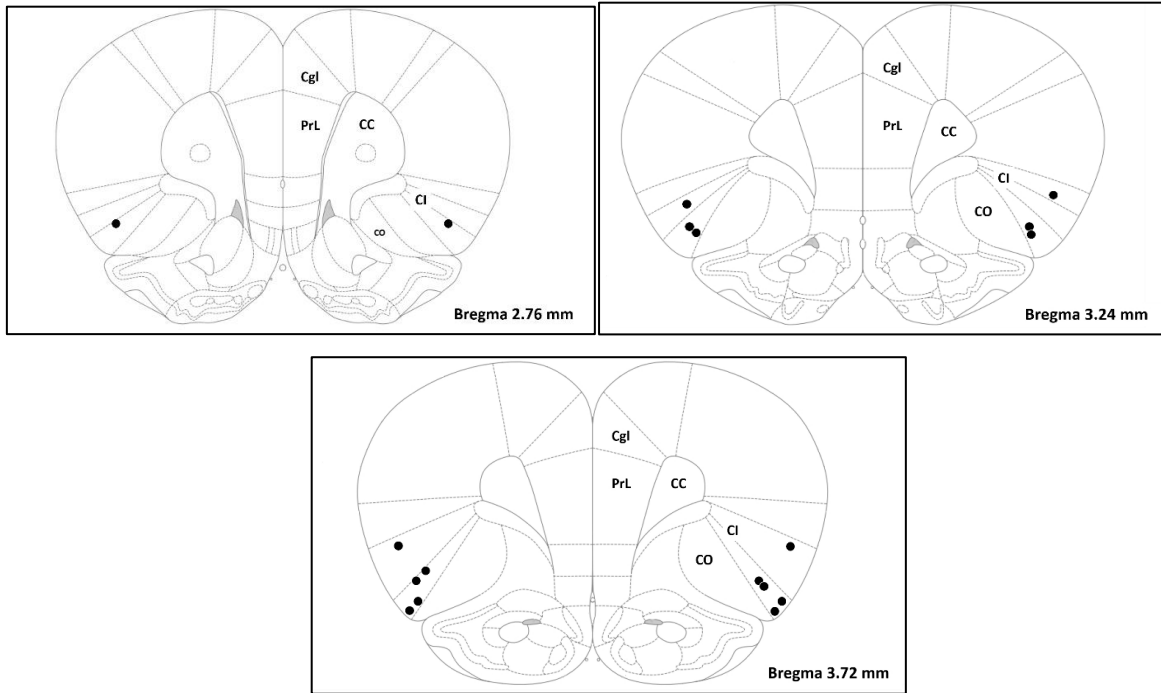


Figure 3.

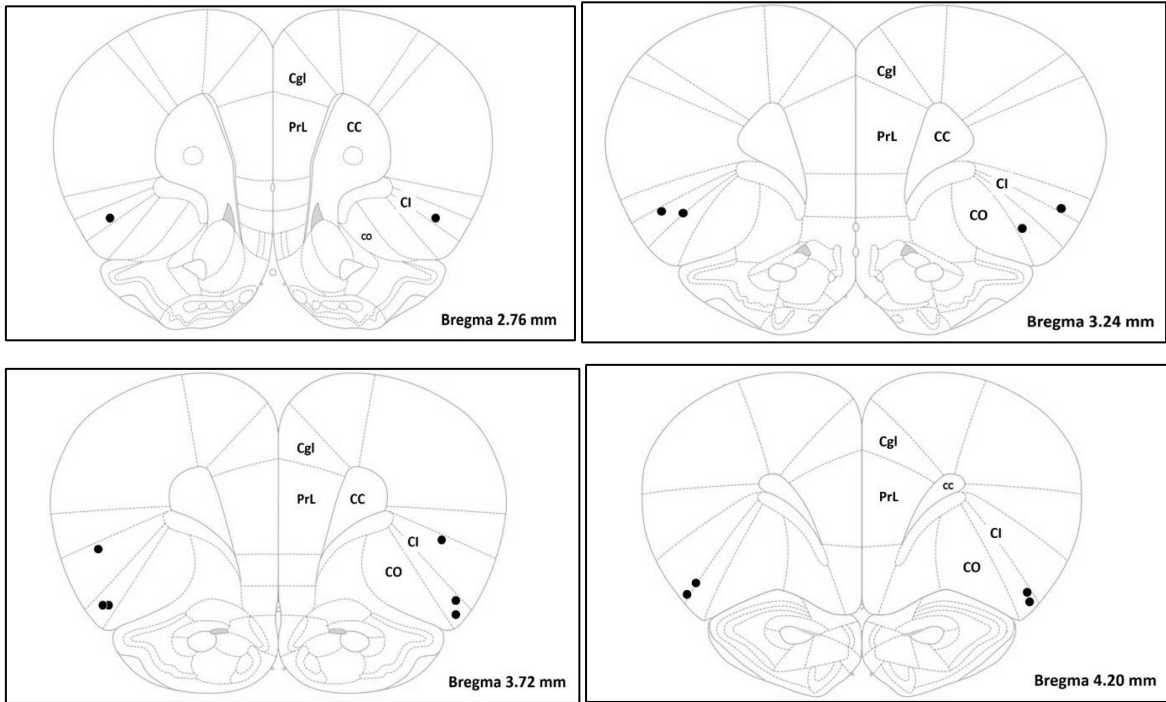


Figure 4.

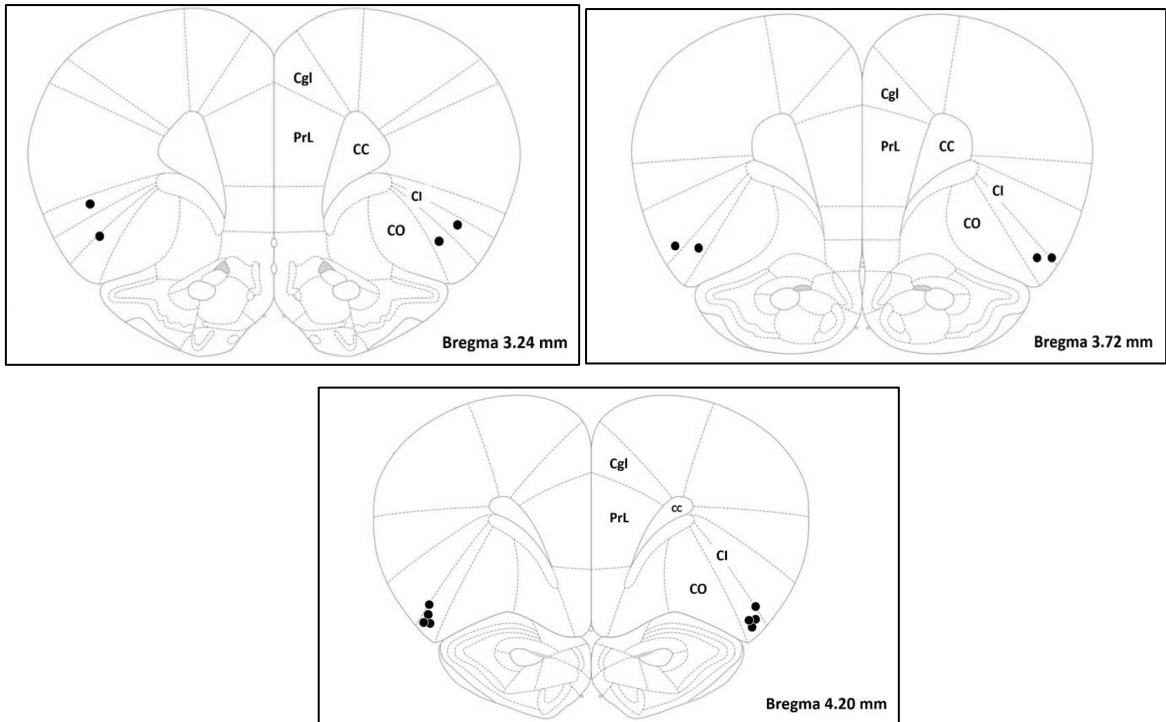


Figure 5.

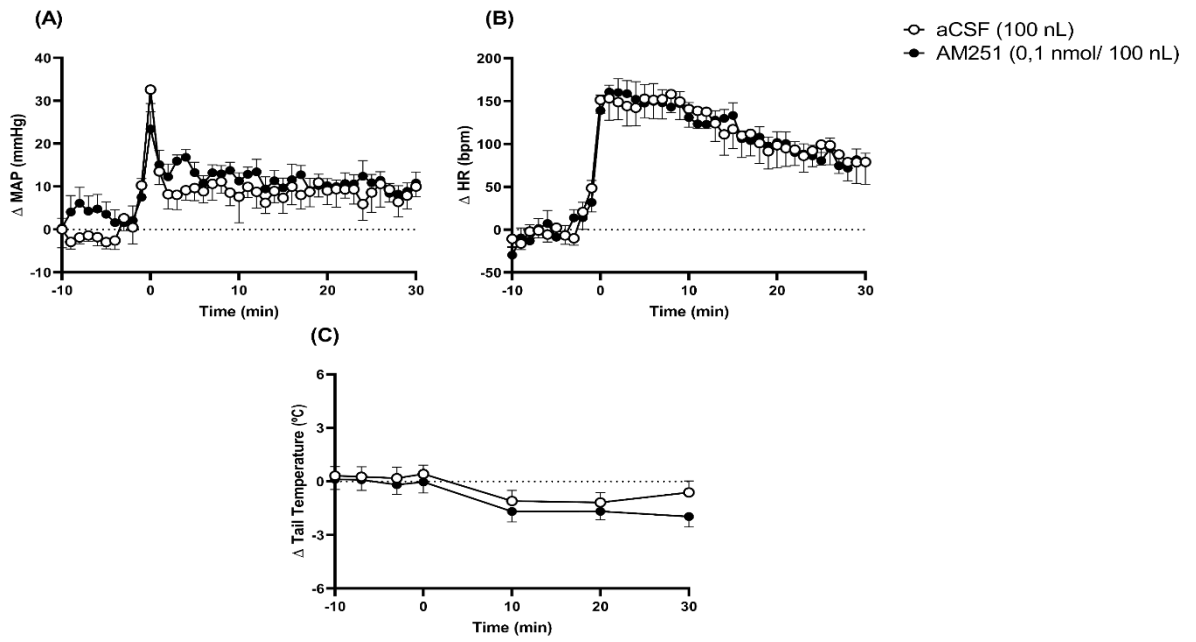


Figure 6.

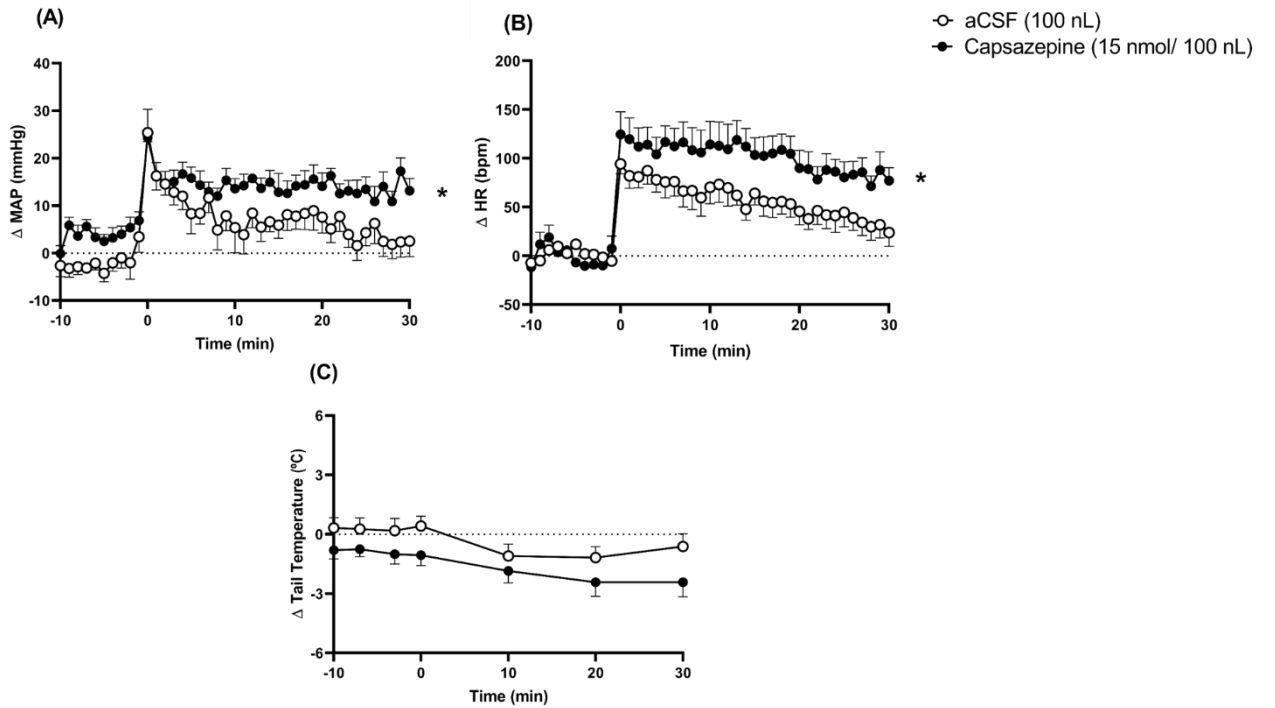


Figure 7.

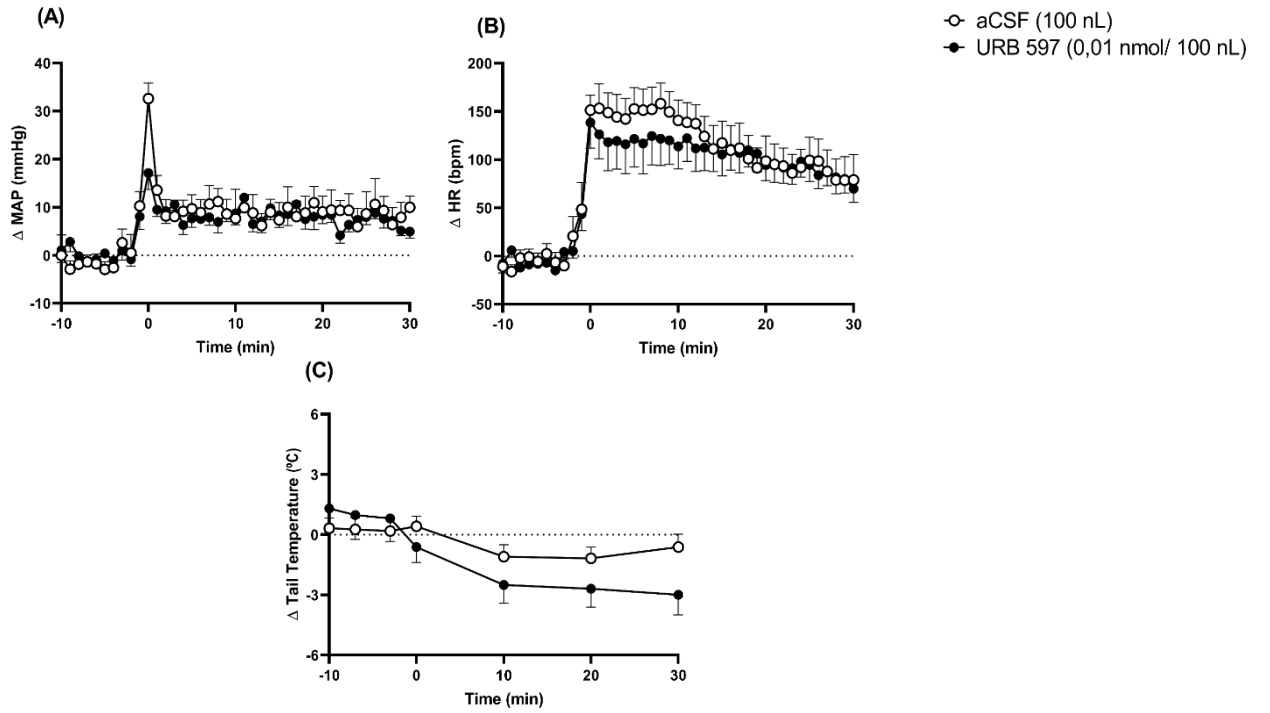


Figure 8.

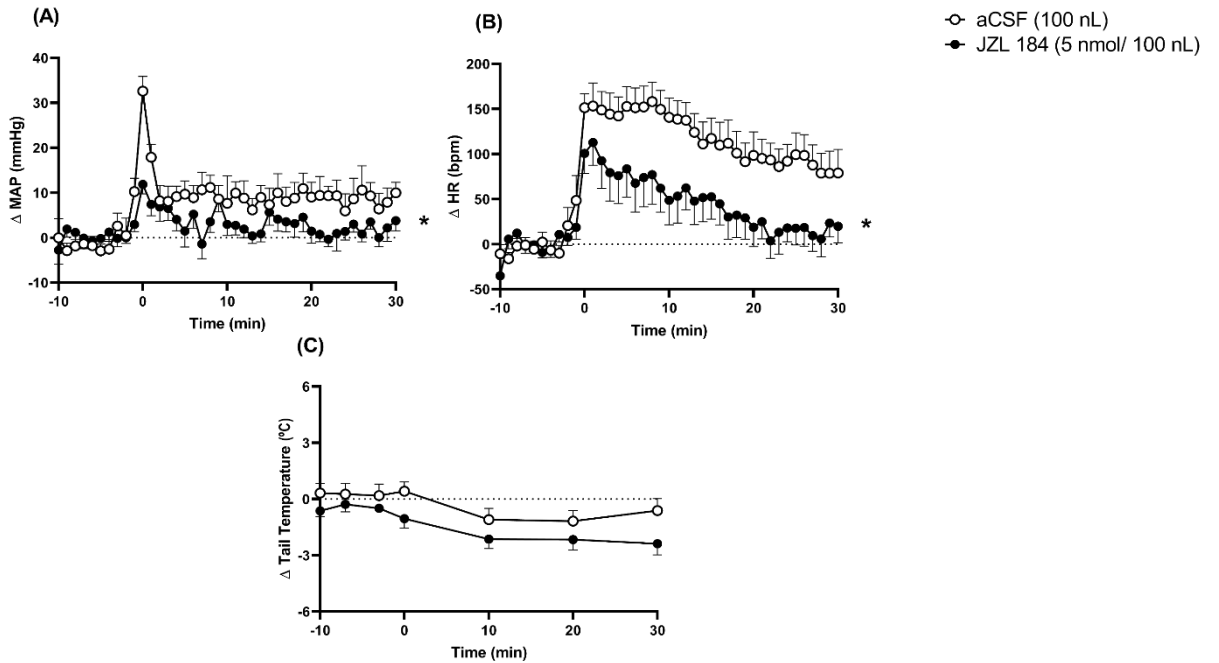


Table 1.

Groups	MAP \pm SEM (mmHg)				HR \pm SEM (bpm)				CT \pm SEM ($^{\circ}$ C)						
	n	Before	After	p	t	n	Before	After	p	t	n	Before	After	p	t
aCSF	7	114,45 \pm 2,54	115,01 \pm 3,75	0,88	0,15	7	337,39 \pm 16,55	350,85 \pm 10,95	0,17	1,52	7	28,53 \pm 0,83	28,78 \pm 0,38	0,66	0,46
AM251	8	104,62 \pm 2,20	107,89 \pm 2,19	0,06	2,14	8	352,98 \pm 11,84	373,27 \pm 15,27	0,04*	2,46	8	28,39 \pm 0,77	28,40 \pm 0,86	0,98	0,02
CAP	9	109,84 \pm 2,76	113,40 \pm 2,64	0,0005*	5,66	9	340,84 \pm 11,08	360,65 \pm 11,55	0,01*	3,02	9	29,24 \pm 0,83	28,39 \pm 0,68	0,08	1,94
URB 597	8	109,65 \pm 4,58	109,67 \pm 3,36	0,99	0,01	8	352,09 \pm 16,08	345,08 \pm 8,52	0,48	0,73	8	29,63 \pm 1,08	30,66 \pm 1,00	0,40	0,88
JZL 184	8	109,41 \pm 3,60	112,73 \pm 3,21	0,03*	2,65	8	350,72 \pm 7,80	389,60 \pm 15,70	0,04*	2,46	8	29,37 \pm 0,52	28,90 \pm 0,70	0,11	1,82